

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de
Yersinia Ruckeri Aisladas de *Oncorhynchus Mykiss*, del
Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo**

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Microbiólogo y Parasitólogo

AUTOR

Hamilton Chen Bueno Mendizábal

ASESOR

Débora Alvarado Iparraguirre

Lima-Perú

2012

Dedico esta tesis a mis padres Edwin, Gladys y a mi familia, los que siempre me apoyaron, los que estuvieron en los momentos más difíciles de este largo camino, y que siempre me alentaron a cumplir con este gran objetivo, finalmente ya ha sido cumplido. Por su esfuerzo y cariño se los dedico también a ustedes Nedyl, Dylan, Wendy y Nelson.

AGRADECIMIENTOS

El camino ha sido largo y difícil pero al fin se ha logrado, todo esto no hubiese sido posible sin la ayuda de muchas personas que con su granito de arena ayudaron a que se culmine con éxito este trabajo.

Mi agradecimiento infinito a mis padres, hermana y toda mi familia porque ellos siempre fueron en todo momento la inspiración para el esfuerzo en la culminación de este gran proyecto.

Agradezco a mi asesora, la Mg. Débora Alvarado Iparraguirre, una gran persona y un ejemplo a seguir, gracias por haberme permitido empezar y concluir con éxito este gran objetivo de vida.

La vida nos pone en el camino personas que te ayudan a mejorar, y que a pesar de todas sus actividades diarias, se dan un espacio para apoyarte, gracias al Dr. Pablo Ramírez Roca, a la Dra. Libertad Alzamora Gonzales y al Blgo. Erasmo Colona Vallejo, personas y grandes profesionales que ayudaron a la mejoría de este gran trabajo.

Quiero agradecer también a todos los miembros del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM, a la Mag. Ruth García, al Blgo. Carlos Tello, al Blgo. Fernando de la Cruz, al Blgo. Abraham Espinoza, con quienes compartí momentos agradables, quienes supieron aconsejarme y apoyarme en la elaboración de esta tesis.

También quiero agradecer a los miembros de la Sección de Ictiopatología de la FMV-UNMSM, a la Dra. Nieves Sandoval por haberme permitido desarrollarme profesionalmente y al Dr. Carlos Fernández Núñez, un gran amigo quien siempre me apoyo con sus valiosos consejos.

Gracias a todos mis amigos de la universidad, en la que pase una de las mejores etapas de mi vida, a mis amigos de siempre, Efra, Henry, Tory, Juan Pablo, Oscar, Geraldine, Gabriela, Roció, Rochi, Cinthia, Nathy B., Nathy A., Melina.

Muchas gracias también a Nataly León, Ángelo Morales, Katherine Roa, Roxana Cabanillas grandes personas que colaboraron arduamente en este proyecto.

Quiero agradecer también a todo el personal del Centro Pisciola “el Ingenio”- Junin, personas solidarias y muy amables, que me ayudaron a obtener las muestras para poder iniciar esta investigación.

Finalmente muchas a gracias todos que quizá en este momento no los menciono pero que en alguna etapa de este trabajo me ayudaron.

Se acaba de terminar esta etapa y empezaran otras, con nuevos retos y dificultades. Estaremos listos para superarlo.

Gracias a todos y que Dios los bendiga.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
I.INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Situación actual de la acuicultura.....	5
2.2. Trucha arco iris.....	8
2.3. Yersiniosis.....	11
2.4. Caracterización genético - molecular.....	20
III. OBJETIVOS.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1. Lugar de estudio y muestreo.....	23
4.2. Procesamiento en el laboratorio.....	23
4.3. Procesamiento para análisis bacteriológico.....	25
4.4. Caracterización fenotípica Preliminar.....	25
4.5. Mantenimiento de cepas.....	25
4.6. Caracterización bioquímica.....	26
4.7. Identificación del biotipo.....	26
4.8. Resistencia antibiótica.....	26
4.9. Procesamiento para análisis molecular.....	27
4.10. Identificación molecular de cepas.....	28
4.11. Caracterización genético - molecular.....	30
4.12. Análisis bioinformático.....	34

V. RESULTADOS.....	35
5.1 Obtención de las cepas.....	35
5.2 Caracterización del Biotipo.....	40
5.3 Resistencia antibiótica.....	40
5.4 Identificación molecular de <i>Yersinia ruckeri</i>	42
5.5 Caracterización genético – molecular.....	45
VI. DISCUSIÓN.....	52
VII. CONCLUSIONES.....	59
VIII. RECOMENDACIONES.....	60
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
X. ANEXOS.....	71

I. LISTA DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato
- FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: "Food and Agriculture Organization")
- mL: Mililitro
- μ L: Microlitro
- V: Voltios
- OIE: Organismo Mundial de la Sanidad Animal (Del inglés: "World Organization for Animal Health")
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Del inglés: "Polymerase Chain Reaction")
- PRODUCE: Ministerio de la Producción.
- PROMPERU: Ministerio de Comercio Exterior y Turismo.
- TM: Toneladas métricas.
- CPI: Centro Piscícola "El Ingenio"
- TSA: Agar Soya Tripticasa (Del inglés: "Trypticasa Soja Agar")
- TSB: Caldo Soya Tripticasa
- NCCLS: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (Del Inglés: Comite National Comitee for clinical Laboratory Standards)

ii. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cosecha de Recursos Hidrobiológicos procedentes de la Acuicultura por ámbito y según especie – TM.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris. Información obtenida de FishBase, basado en la publicación de Smith, 1989.

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de la bacteria *Yersinia ruckeri*

Tabla 4. Componentes del master mix - PCR para la identificación de *Yersinia ruckeri* en un volumen de reacción total de 20 µL

Tabla 5. Componentes para ERIC - PCR para un volumen de reacción total de 25 µL.

Tabla 6. Componentes para REP-PCR para un volumen de reacción total de 25 µL

Tabla 7. Componentes para BOX - PCR para un volumen de reacción total de 25 µL

Tabla 8. Número de aislados y cepas presuntivas del Género *Yersinia*

Tabla 9. Cepas presuntivas de *Yersinia ruckeri* según fuente de aislamiento.

Tabla 10. Resultados de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas a partir de Peces sin Sintomatología de la EBR.

Tabla 11. Resultados de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas a partir de Peces con Sintomatología de la EBR.

Tabla 12. Susceptibilidad antibiótica de cepas provenientes de peces con sintomatología.

Tabla 13. Susceptibilidad antibiótica de cepas provenientes de peces sin sintomatología.

Tabla 14. Número de cepas multiresistentes.

iii. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contribución relativa de la acuicultura y la pesca de captura al consumo de Pescado.

Figura 2. Pesca de captura marina y continental - diez principales países productores en 2008.

Figura 3. Trucha Arco iris y su coloración característica.

Figura 4. Procesamiento de las truchas – necropsia – en Centro Piscícola “El Ingenio”.

Figura 5. Exposición de los órganos internos *in situ* de *Oncorhynchus mykiss*.

Figura 6. Colonias de *Yersinia ruckeri* en Agar TSA, circulares de entre 1-3 mm de diámetro.

Figura 7. Migración de las colonias de *Yersinia ruckeri* en el ensayo de motilidad según, Coquet *et al.*, (2002).

Figura 8. Comparación de la identificación de *Yersinia ruckeri* a través de pruebas bioquímicas y PCR.

Figura 9. Amplificados gen RNAr 16S de *Yersinia ruckeri*.

Figura 10. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* aislados según órgano, obtenidas de peces sin sintomatología de EBR.

Figura 11. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* aislados según órgano, obtenidas de peces con sintomatología de EBR.

Figura 12. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ERIC-PCR.

Figura 13. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante REP-PCR.

Figura 14. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante BOX-PCR.

Figura 15. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ERIC, REP, BOX PCR.

Figura Anexo: 10.5. Toma y selección de muestra.

RESUMEN

La demanda de trucha arco iris en nuestro país se ha incrementado significativamente en estos últimos años, por ello la industria dedicada al cultivo de esta especie también ha incrementado su número, y los que ya se dedicaban a esta actividad se han visto en la necesidad de aumentar la producción de truchas cultivadas. La enfermedad entérica de la boca roja es una de las principales enfermedades que afectan al cultivo de las truchas, generando grandes pérdidas económicas, el agente etiológico es la bacteria *Yersinia ruckeri*, la cual se transmite de un pez a otro por contacto y a través del agua. La presente investigación tuvo como objetivo, aislar y caracterizar a nivel fenotípico y molecular estirpes de *Yersinia ruckeri* en truchas arco iris obtenidas en el centro piscícola “El Ingenio” – Huancayo, para incrementar el conocimiento de la biología de este agente patológico, y relacionar las estirpes aisladas a partir de peces con sintomatología de enfermedad, con las aisladas a partir de peces sin sintomatología de enfermedad.

El presente estudio se desarrolló en el Centro Piscícola “El Ingenio”- Junin y en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la UNMSM- Lima, en el año 2010. Se recolectaron peces con sintomatología de enfermedad entérica de la boca roja (EBR) y sin sintomatología de ésta, identificándose a través de pruebas bioquímicas, 34 cepas presuntivas de *Y.ruckeri* y confirmándose por PCR, 30 de ellas; todas las cepas identificadas pertenecen al biotipo 1. Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana encontrándose cepas resistentes a ácido oxolínico, cloranfenicol, tetraciclina y amoxicilina; se reporta 4 cepas con resistencia múltiple. Para el análisis genético molecular se utilizó las técnicas *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* PCR (ERIC-PCR), *repetitive extragenic palindromic* PCR (REP-PCR) y *extragenic repeating elements* PCR (BOX-PCR), determinándose variabilidad intraespecífica tanto en cepas aisladas de peces con sintomatología como en peces sin sintomatología de la EBR.

Palabras clave: Enfermedad entérica de la boca roja (EBR), *Yersinia ruckeri*, trucha arco iris, caracterización fenotípica de *Y. ruckeri*, caracterización molecular de *Y. ruckeri*.

ABSTRACT

Demand for rainbow trout in our country has increased significantly in recent years, so the industry dedicated to the culture of this species has also increased its number, and those already engaged in this activity have been in need of increase production of farmed trout. The disease enteric red mouth is one of the major diseases affecting the cultivation of trout, causing major economic losses, the causative agent is the bacterium *Yersinia ruckeri*, which is transmitted from one fish to another by contact and by water . The present study aimed to isolate and characterize phenotypic and molecular strains of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout fish obtained in the center "El Ingenio" - Huancayo, to increase knowledge of the biology of this disease agent, and relate strains isolated from fish with symptoms of disease, with those isolated from fish without symptoms of disease.

This study was to realize at the Fish Farming Center "El Ingenio" - Junin and laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology of San Marcos, Lima, in the 2010. Fish were collected with symptoms of enteric disease red mouth (EBR) and without symptoms of this, identified through biochemical tests, 34 strains *Y.ruckeri* presumptive and confirmed by PCR, 30 of them, all strains identified belong to biotype 1. Susceptibility testing was performed antimicrobial resistant strains found oxolinic acid, chloramphenicol, tetracycline, amoxicillin; 4 are reported multiple resistant strains. For molecular genetic analysis techniques used Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) and PCR extragenic repeating elements (BOX-PCR), determining intraspecific variability in strains isolated from fish with symptoms like fish without symptoms of EBR.

Keywords: Enteric redmouth disease (ERM), *Yersinia ruckeri*, rainbow trout, phenotypic characterization of *Y. ruckeri*, molecular characterization of *Y. ruckeri*.

I. INTRODUCCIÓN

La industria acuícola es una actividad muy importante a nivel mundial y en nuestro país, siendo uno de los sectores de producción con mayor crecimiento y rápida expansión en la industria nacional e internacional. La industria acuícola a nivel mundial produce alrededor de 53 millones de toneladas de productos hidrobiológicos, dentro de los cuales se encuentran peces, crustáceos, moluscos, entre otras especies, tanto de agua dulce como de mar (FAO, 2010a).

La producción de peces diádromos en el 2008 estuvo dominada por el salmón del Atlántico con 1,5 millones de toneladas (44%), el chano con 0,68 millones de toneladas (20,4%) y la trucha arco iris con 0,58 millones de toneladas (17,4%), siendo Noruega y Chile los dos mayores productores mundiales de salmónidos; generando el 36,4% y el 28%, de la producción mundial respectivamente. La creciente producción de salmón, trucha y otras especies de agua dulce ha dado lugar a un incremento considerable del consumo anual *per cápita* de especies de agua dulce y diádromos desde 1,5 kg en 1961 hasta 5,5 kg en 2007 (FAO, 2010b).

En nuestro país la acuicultura también ha experimentado un significativo progreso en estos últimos años, constituyéndose en una actividad en constante crecimiento dentro de la cual la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es la principal especie cultivada, logrando una producción de 2 866 TM en el año 2001 que ascendió a 14 541 TM en el año 2010, siendo los departamentos de Junín y Puno los principales centros de cultivo en nuestro país (PRODUCE, 2010).

La creciente demanda en nuestro país por el consumo de peces dulciacuícolas y en especial el consumo de truchas, hace que cada día aumenten las piscigranjas que se dedican al cultivo de estos animales para satisfacer un mercado que se encuentra creciendo (PRODUCE, 2009).

En la actualidad se conoce la presencia de diversas enfermedades infecciosas que afectan la producción acuícola, entre ellas se encuentra la Yersiniosis o enfermedad entérica de la boca roja (*Enteric Redmouth-ERM* sus siglas en inglés), la cual representa uno de los principales problemas sanitarios y económicos a nivel mundial (Furones *et al.* 1993), en nuestro país también representa un problema en las

piscifactorías del Perú, sin embargo existe poca información sobre el desarrollo de esta enfermedad y otras presentes en la trucha arco iris (Bravo & Kojagura, 2004).

La enfermedad entérica de la boca roja (EBR), causada por la bacteria *Yersinia ruckeri*, es una enfermedad que afecta principalmente a la trucha arco iris; esta enfermedad ha sido reportada en diversas especies de peces y en diferentes partes del mundo (Furones, Rodgers & Munn 1993).

Yersinia ruckeri es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, ampliamente distribuida en las diversas industrias salmónidas del mundo (Bravo & Kojagura, 2004; Evenhuis *et al.*, 2009). Esta bacteria es poco exigente por lo que su aislamiento es relativamente fácil de realizar, puede crecer en varios medios de cultivo y con pruebas bioquímicas se puede llegar a un diagnóstico presuntivo confiable (Troncoso *et al.*, 1994). Para la identificación del género se requiere el aislamiento de bacterias Gram-negativas, de motilidad variable con características bioquímicas como; citocromo oxidasa negativa, producción de ácido a partir de glucosa (sin producción de gas), ornitina y lisina descarboxilasa positivos, arginina dihidrolasa negativo, aglutinación positiva con suero de conejo anti-*Y. ruckeri*, entre otras (Bullock *et al.*, 1978; Austin & Austin, 2007; Akhlaghi & Sharifi, 2008).

Para confirmar la especie se puede recurrir a técnicas basadas en métodos moleculares, entre los que destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la detección de *Y. ruckeri* se han descrito dos sistemas de PCR basados respectivamente en la amplificación de un gen cromosómico del sistema *quorum sensing* desarrollado por Temprano *et al.*, (2001) y en la amplificación de una región del ADN que codifica el ARN 16S realizado por Gibello *et al.*, (1999); ambos métodos son específicos de esta especie (Gibello *et al.*, 1999).

La fase aguda de la yersiniosis se caracteriza por su alta letalidad debido a la aparición de septicemia; esta enfermedad es inversamente proporcional con la edad, por lo que la tasa de mortalidad es mayor cuando menor es la edad del pez (Rodgers, 1991). Sin embargo en peces adultos, el cuadro cursa como una infección crónica teniendo como principales signos clínicos a la congestión capilar y venosa del cerebro y los vasos oculares además presentan lesiones hemorrágicas en músculos, intestinos, órganos internos y en la superficie corporal. El enrojecimiento de la boca del pez, de donde deriva el nombre de esta patología, es un signo observado con relativa

baja frecuencia ya que parece manifestarse tardíamente en los últimos estadios de la fase crónica de la enfermedad (Troncoso *et al.*, 1994). El modo de transmisión es horizontal y se ha relacionado con peces portadores silvestres o de cría y otros vectores, como invertebrados acuáticos y aves (Willumsen, 1989; Coquet *et al.*, 2002).

La caracterización clínica así como los análisis anatomopatológicos son de mucha ayuda en el estudio de las patologías infecciosas en peces de origen bacteriano, pero ninguna de las dos permite dilucidar con mucha certeza la etiología particular de un proceso de este tipo, en estos huéspedes. Además se conoce que la respuesta del salmón a la infección bacteriana es estereotipada, ya que cualquiera fuese su etiología los cambios patológicos son a menudo muy similares e indistinguibles entre sí. Por ello es necesario contar con métodos microbiológicos para confirmar la presencia del agente responsable de los cuadros infecciosos de los salmónidos (Troncoso *et al.*, 1994).

En nuestro país se reportó por primera vez la presencia de *Yersinia ruckeri*, en 1998, en truchas arco iris procedentes de piscigranjas de la región Junín (Bravo & Kojagura, 2004). Desde entonces se ha conocido la presencia de *Y. ruckeri* en toda esa área, y actualmente esta enfermedad se encuentra diseminada en las principales piscigranjas de truchas de nuestro país (Kojagura & Alvarado, 2006; Sánchez, 2010; Sierralta, 2011; Fernández, 2011).

Por ello el empleo de diversos métodos, así como el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido, implica que a futuro se pueda contar con datos epidemiológicos de gran utilidad para orientar el diagnóstico temprano de ésta y otras enfermedades bacterianas en peces. Permitiendo adoptar medidas de manejo profilácticas adecuadas y oportunas que reduzcan las mermas económicas que causan en la industria acuícola (Fernández, 2011).

En la actualidad la industria acuícola y en especial el cultivo de trucha, cuenta con apoyo de parte del gobierno central y los gobiernos regionales, con el objetivo de incrementar la producción para satisfacer la demanda del mercado, con el aumento de la producción también es necesaria la implementación de herramientas para garantizar el buen estado sanitario del pez y del lugar donde se cultiva, por ello es importante conocer las diferentes enfermedades y problemas sanitarios que se generan en su

cultivo, ya que la información aún es escasa en comparación con otros países productores de truchas y salmones.

Por ello la presente investigación permitirá determinar diferencias entre fenotipo y genotipo de las cepas de *Yersinia ruckeri* relacionadas al cuadro sintomatológico de la enfermedad entérica de la boca roja y las que no lo están, todas éstas cepas aisladas en el Centro Piscícola “El Ingenio”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

El pescado representó el 15,7 % del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6,1 % de todas las proteínas consumidas en el 2007. Mundialmente el pescado alimenta a más de 1 500 millones de personas proporcionado cerca del 20 % de proteínas animales y a 3 000 millones de personas al menos el 15 % de dichas proteínas. Por su parte en el 2008, la acuicultura generó en el mundo el 46 % del suministro total de pescado comestible (Figura 1). Además es importante recalcar que en el 2008, el Perú junto a China e Indonesia, fueron los principales países productores de pescado (Figura 2) (FAO, 2010b).

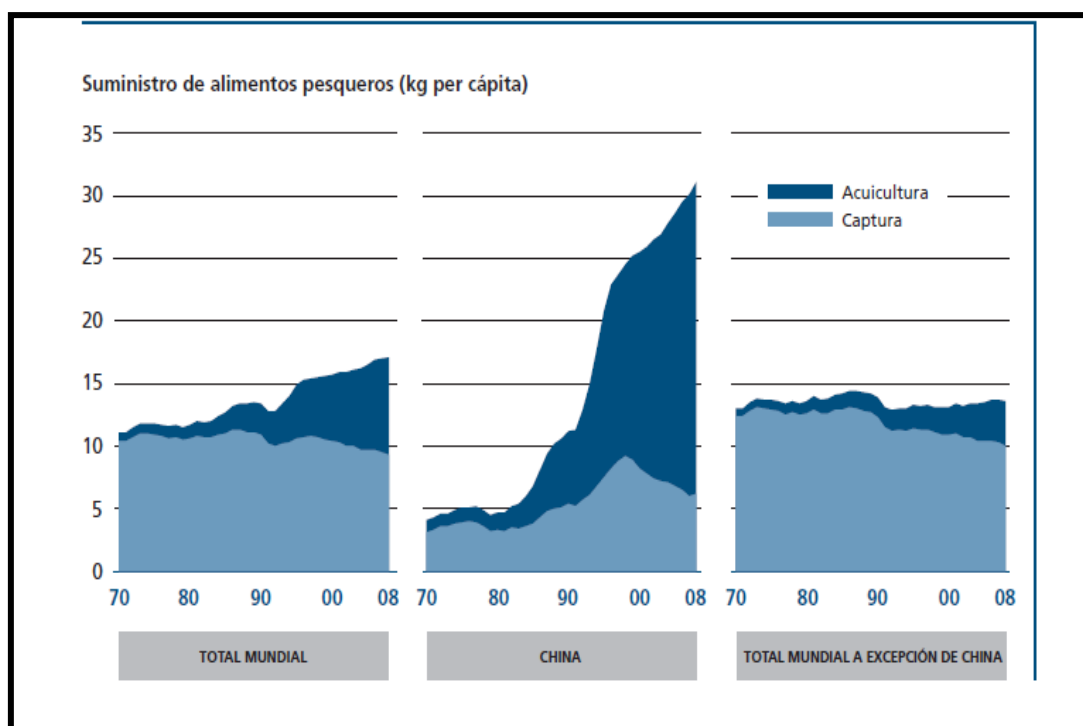


Figura 1. Contribución relativa de la acuicultura y la pesca de captura al consumo de Pescado (FAO, 2010b).

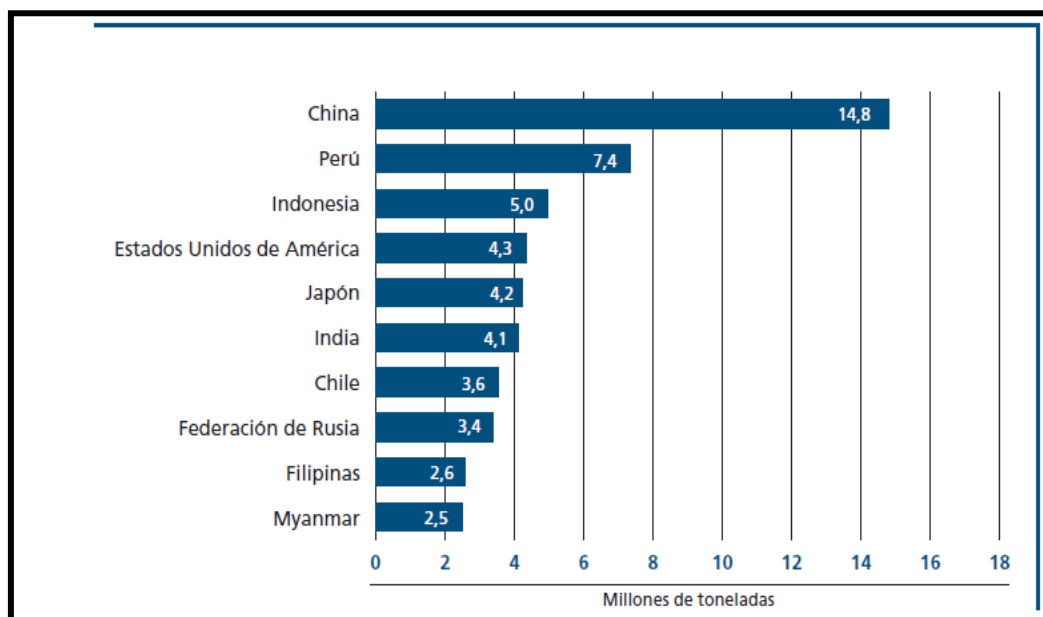


Figura 2. Pesca de captura marina y continental - diez principales países productores en 2008 (FAO, 2010b).

Dentro del sector de producción de alimentos de origen animal, la acuicultura es la que mantiene un crecimiento rápido, más que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal, y a mayor ritmo que la población, con un incremento del suministro acuícola per cápita desde 0,7 kg en 1970 hasta 7,8 kg en 2008, lo que constituye un crecimiento medio anual del 6,6 %, esperando que ésta supere a la pesca de captura como fuente de pescado comestible. A comienzos de la década del 50 la producción acuícola (a excepción de las plantas acuáticas) era inferior a 1 millón de toneladas anuales, en 2008 ascendió a 52,5 millones de toneladas con un valor de 98 400 millones de USD (FAO, 2010b).

Mundialmente las regiones de Asia y del Pacífico son las que lideran la acuicultura, la cual aporta el 89% de la producción en cantidad y el 79% en valor económico. Este dominio se debe principalmente a la enorme producción de China, la cual representa el 62% de la producción mundial en términos de cantidad y el 51% del valor mundial. En Latinoamérica, los principales productores acuícolas son Brasil, México, Ecuador y Chile, y gracias a ello la acuicultura ha registrado un avance

notable, liderando tal avance y produciendo cantidades cada vez mayores de salmón, trucha, tilapia, camarones y moluscos (FAO, 2010b).

La creciente producción de salmón, trucha y otras especies de agua dulce han logrado incrementar el consumo anual per cápita de especies de agua dulce y diádmomas de 1,5 kg en el año 1961 hasta 5,5 kg en 2007. A nivel mundial el comercio del salmón, incluida la trucha ha tenido un incremento notable en los últimos decenios, situándose en la actualidad en 12%, sin embargo en el año 2009 hubo una reducción de la producción de salmón en uno de los principales productores de ésta, Chile, debido a las enfermedades, dentro de las cuales el virus ISA (anemia infecciosa del salmón), ha sido la más perjudicial originando grandes pérdidas en cerca del 50% de su producción, la recuperación de esta catástrofe ha sido difícil y requiere de una mayor investigación y mejores regulaciones (FAO, 2010b).

Según informes de la FAO, 69 países se dedican a la producción de trucha arco iris, la mayoría a menor escala en comparación a los principales centros productores de trucha arco iris como Europa, Norteamérica, Chile, Japón y Australia (FAO, 2010b).

La acuicultura en nuestro país se ha incrementado en los últimos años, siendo el cultivo de la trucha la que presenta mayor crecimiento, localizadas principalmente en zonas altoandinas, cosechándose en el año 2010 unas 14 250 TM (Tabla 1), con Puno y Junín, como ciudades en las que se ubican las principales empresas dedicadas a esta actividad (PRODUCE, 2010).

Se estima que entre los años 2010-2015, la producción de la acuicultura seguirá en crecimiento, contribuyendo con el 50% de la producción mundial de la pesca, logrando de esa manera convertirse en un sector económico muy importante para las generaciones venideras, siendo el Perú uno de los países con mayores expectativas para que esta actividad siga en aumento (PRODUCE, 2010).

Tabla 1. Cosecha de Recursos Hidrobiológicos procedentes de la Acuicultura por ámbito y según especie – TM (PRODUCE, 2010).

Ámbito / Especie	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Total	7 539	11 534	13 610	22 114	25 978	28 387	39 531	43 119	44 317	89 021
Continental	2 872	3 231	3 601	6 550	6 586	6 793	9 348	14 986	14 837	17 320
Boquichico	7	6	103	82	60	12	15	25	27	36
Camarón Gigante de Malasia	6	7	8	11	18	11	4	6	11	15
Carachama	-	1	0	0	0	0	1	4	1	22
Carpa	10	6	0	1	3	11	13	15	15	19
Gamitana	20	54	203	241	251	344	414	539	564	680
Paco	20	36	9	6	43	38	34	71	75	101
Pacotana	-	4	6	3	17	6	86	59	12	3
Paiche	-	-	0	2	14	2	-	1	3	48
Tilapia	223	122	112	1 326	619	494	1 741	1 714	1 261	2 013
Trucha	2 586	2 981	3 111	4 699	5 475	5 794	6 997	12 497	12 817	14 250
Sabalo	-	10	45	177	85	78	41	52	49	114
Otros	-	4	4	2	1	3	2	3	2	19
Marítimo	4 667	8 303	10 009	15 564	19 392	21 594	30 183	28 133	29 480	71 701
Concha de Abanico	3 913	5 701	6 670	10 485	11 065	12 337	18 518	14 802	16 047	58 101
Langostino	731	2 593	3 328	5 073	8 324	9 257	11 657	13 314	13 425	13 598
Ostras del Pacífico	8	9	11	6	3	-	-	-	-	-
Otros	15	-	-	-	-	-	8	17	8	2

Nota: En el 2010 la cosecha de concha de abanico incluye lo procedente de Parachique, lo cual correspondiente a las asociaciones formalizadas a fines del periodo 2009 e inicio del 2010. Los totales se han reajustado debido a las correcciones en la especie trucha para el 2000 y 2001 y a la no inclusión de las especies provenientes de repoblamiento (Pejerrey y Abalon). "0" Corresponde a cifras menores que 0.5 TM.

Fuente: Direcciones Regionales de Producción (DIREPRO) y Empresas Acuícolas.

TM: toneladas métricas

2.2. TRUCHA ARCO IRIS

La trucha arco iris, es un pez que pertenece a la familia de los salmónidos, su nombre científico es *Oncorhynchus mykiss*. Es una especie introducida a nuestro país, siendo originaria de las desembocaduras del Océano Pacífico en Norte América. La trucha arco iris es una especie muy resistente, de rápido crecimiento, tolerantes a una amplia gama de ambientes y manipulación, su nombre deriva de la peculiar coloración que posee (Figura 3), la misma que varía en función del medio, la talla, sexo, tipo de alimentación, y grado de maduración sexual (Aquino *et al.*, 2009). La trucha fue la primera especie en el desarrollo de la acuicultura peruana y en la actualidad es la especie de origen continental que más se cosecha con un 82% del total de especies (PRODUCE, 2010).

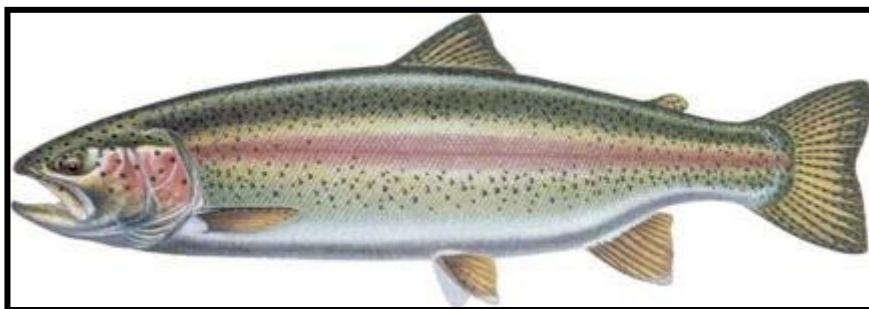


Figura 3. Trucha Arco iris y su coloración característica (Aquino *et al.*, 2009).

2.2.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica de la especie se describe en la Tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de la trucha arco iris.

Información obtenida de *FishBase*, basado en la publicación de Smith, 1989.

Reino	Animalia
Phylum	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Salmoniformes
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Especie	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
Nombre común	"trucha arco iris"

2.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS

La trucha pertenece a la familia *Salmonidae* dentro del orden de los salmoniformes (Tabla 2), donde las truchas verdaderas constituyen el género *Salmo*, con dos únicas especies, la trucha común europea y el salmón del atlántico.

La trucha arco iris se clasificaba antes como *Salmo gairdnerii* Richardson, pero tras recientes revisiones sistemáticas se ha propuesto para esta especie el nuevo nombre científico de *Oncorhynchus mykiss*.

Se caracteriza por tener el cuerpo cubierto con finas escamas de forma fusiforme y mucus, la coloración de la trucha varía de acuerdo al ambiente en que vive, edad, sexo y otros factores como la influencia del medio ambiente que lo rodea; en riachuelos sombreados presenta color plomo oscuro, mientras que en estanques y jaulas flotantes al estar bien expuestos a los rayos solares ofrece una tonalidad más clara; de un color azulado a verde oliva en la parte superior o dorso, en las partes laterales una franja rojiza plateado iridiscente y con el abdomen blando, además posee bastantes lunares negros y marrones en la piel (Rojas *et al.*, 2008).

Los alevines pueden ser iniciados fácilmente a una alimentación con una dieta artificial. Puede ocupar diversos hábitats, desde un ciclo de vida anádromo (océano-agua dulce) hasta habitar sólo en agua dulce (FAO, 2010b).

La trucha arco iris se ha introducido a las aguas en todos los continentes salvo en la Antártida, con fines de pesca recreativa y de acuicultura (FAO, 2010b). La pesca, así como el cultivo de trucha se practica en las cuencas continentales tropicales y sub tropicales de muchos países de Asia, Este de África y Sudamérica (Dill & Cordone 1997; FAO, 2010b).

La acuicultura peruana tiene en su desarrollo, como primera especie a la trucha, importándose en 1982 aproximadamente 50 000 ovas embrionadas, que fueron traídas desde los Estados Unidos hasta un criadero particular en la Oroya (Godoy, 2003).

2.2.3 CULTIVO EN EL PERÚ

La acuicultura en nuestro país se viene practicando con una base técnica desde el siglo XX, se conoce poco de prácticas de la acuicultura en la época pre inca e inca, aun cuando en ambas épocas hubo gran consumo de pescado. La trucha arco iris es originaria de la región del río Sacramento, California, de la costa occidental de los Estados Unidos de Norte América, llegando al Perú en 1925, a través de

servidores de la Cerro de Pasco *Copper Corporation* con la embajada de dicho país, instalándose así el primer criadero de trucha en la Oroya. El cultivo de trucha en el Perú desde su inicio en Yauli, se fue propagando a diversos lugares, como Ingenio a orillas del río Chía, en la laguna de Chaquicocha, en el Lago Titicaca, mas tarde también en la estación piscícola Santa Eulalia, en Cajamarca, en Huaraz-Ancash, en Huanuco, en Pasco y en las otras ciudades (Bedriñana, 2009).

2.3. YERSINIOSIS

La yersiniosis es una enfermedad infectocontagiosa, puede ser de carácter agudo o crónico que afecta a diversos peces, también llamada enfermedad entérica de la boca roja (EBR), es considerada una de las enfermedades más comunes en la acuicultura americana y europea, y una de las enfermedades endémicas en esos lugares. Es causada por la bacteria Gram-negativa *Yersinia ruckeri* que está presente en un gran número de especies que son consideradas como portadores asintomáticos, prácticamente indetectable que sólo aparece en situaciones de estrés, particularmente asociado con sistemas intensivos de cultivo y mala calidad de agua, pudiendo resultar en grandes pérdidas económicas (De la Cruz *et al.*, 1986; Woo & Bruno, 1999).

Es una de las enfermedades más comunes en la industria de los salmones, la yersiniosis o EBR en los años 50 estuvo asociada con alta mortalidad en cultivos de truchas arco iris en Idaho (Davies & Frerichs, 1989).

2.3.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

En 1966 Ross *et al.*, en Hagerman Valley, Idaho, USA describen por primera vez una bacteria asociada con la enfermedad de boca roja en *Salmo gairdneri*, reclasificada como *Oncorhynchus mykiss*, describiendo una bacteria Gram negativa, de forma bacilar, oxidasa negativa, con flagelos peritricos, fermentativo que puede ser aislado a partir de tejido de riñón de truchas arco iris afectados con la enfermedad de boca roja. Estas bacterias fueron cultivadas y caracterizadas bioquímicamente, por hibridación de ADN y por el porcentaje de guanina y citosina en el ADN. Estos estudios confirmaron que esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, además de ello la comparación a otras especies de enterobacterias tiene un 30% de similitud de ADN homólogo a especies de *Serratia*

y *Yersinia*, la comparación de las reacciones bioquímicas de la bacteria asociada a la boca roja y *Serratia* indicaron que hay muchas diferencias entre estos microorganismos y que bioquímicamente la bacteria asociada a la boca roja se asemeja más a *Yersinia*. Además por reacciones bioquímicas y porcentajes de guanina y citosina, la bacteria asociada a la boca roja es considerada una nueva especie de *Yersinia*, para la cual se propone el nombre de *Yersinia ruckeri* en honor a Robert R. Rucker, quien pasó muchos años estudiando la enfermedad de la boca roja y su agente etiológico (Ewing *et al.*, 1978).

En el Perú se reporta por primera vez la presencia de *Yersinia ruckeri* en truchas arco iris cultivadas en piscigranjas de la región Junín, localizadas por encima de los 3000 msnm (Bravo & Kojagura; 2004).

2.3.2. CARACTERÍSTICAS DE *Yersinia ruckeri*

Yersinia ruckeri es una bacteria con morfología cocobacilar, o bacilo corto, Gram negativa, es considerada muy pequeña ($0.5 \times 1.5 - 2.0 \mu\text{m}$), sola o asociada en pequeñas cadenas, con flagelos peritricos, aunque el tamaño puede variar dependiendo de la edad del cultivo (Bullock *et al.*, 1978), la mayoría de las cepas son motiles (Busch, 1983), pero esto depende de factores como la temperatura, así a temperaturas de entre 18-27°C son motiles, sin embargo a 9°C los flagelos presentes se encuentran sin funcionamiento, mientras a 35°C estos están ausente (O'Leary, 1979).

Los cultivos de *Yersinia ruckeri* pueden crecer muy bien en diferentes tipos de medios como el Agar tripticasa de soja (TSA), presentando generalmente colonias que crecen, normalmente con un diámetro de 1 a 2 mm, redondas, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos. Estas colonias no presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta pero pueden aparecer ligeramente iridiscentes al reflejo de la luz. A la luz natural son translúcidas con un color blanco cremoso (Busch & Lingg, 1975; Austin *et al.*, 1982; Busch, 1982; Furones *et al.*, 1993; Buller, 2004). Esta bacteria es anaerobia facultativa y en relación con su crecimiento en diferentes medios se determinó que el 100 % de los aislados crece en agar Mac Conkey, el 88 % crece en agar Salmonella - shigella, 56 % en agar bilis verde

brillante y no crece en agar Bilis Verde Brillante enriquecido con selenito (Ewing *et al.*, 1978).

Los aislados de *Yersinia ruckeri* pueden ser divididos en grupos clonales basados en biotipos, serotipos y proteínas de membrana externa de la bacteria, y dichos grupos clonales podrían estar relacionado con la virulencia del microorganismo.

2.3.3. BIOTIPOS

Las cepas de *Yersinia ruckeri* pueden ser divididos en 2 biotipos, biotipo 1; y 2, basados en su capacidad de hidrolizar el Tween 20 y 80, y en la motilidad (Tobback, 2009).

Busch (1982) describió cepas de *Y. ruckeri* que eran inmóviles y que no degradaban el Tween 20 y 80, encontrando que en su estudio que 18% de las cepas eran inmóviles, y el 14% no hidrolizaba el tween 80, pero no se percató que estas características estaban relacionadas. Davies & Frerichs (1989), en sus estudios encuentran que de las 147 cepas aisladas, de diferentes áreas geográficas, todas las cepas inmóviles obtenidas no hidrolizaban el tween y viceversa, a este grupo claramente definido de aislados de Inglaterra y Noruega lo designaron como *Yersinia ruckeri* biotipo 2, para poder diferenciarlo del biotipo descrito originalmente, el de Hagerman aislado en Idaho.

2.3.4. TAXONOMÍA

Yersinia ruckeri ha sido descrita desde 1966, desde entonces se la ha incluido dentro del grupo de las enterobacterias, y ubicado en el género *Yersinia*, Tabla 3 (Brenner *et al.*, 2005).

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de la bacteria *Yersinia ruckeri*

Clasificación	Taxonómica
Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Yersinia
Especie	<i>Yersinia ruckeri</i>

Fuente: Brenner *et al.*, (2005).

2.3.5. SIGNOS CLÍNICOS

En la etapa inicial de la enfermedad entérica de la boca roja, hay presencia en el pez de letargia, melanosis, a menudo se puede observar anorexia, también puede haber enrojecimiento de la boca, lengua, áreas de la mandíbula y opérculo (Busch, 1983; Rucker, 1966), pero esta característica muchas veces no es apreciable en algunos brotes, tal y como sucedió en el Reino Unido, en la cual no había presencia del signo común boca roja (Austin *et al.*, 1986; Fuhrmann *et al.*, 1984), aunque este signo puede estar presente a veces en etapas tardías de la infección crónica (Rodgers, 1992). También pueden presentar exoftalmia unilateral, bilateral y ceguera producto de la ruptura de la córnea. Internamente, se describen hemorragias en el bazo, ciegos pilóricos, tejido adiposo, vejiga natatoria y tejido muscular (Rodgers, 1991; Furones *et al.*, 1993; Austin & Austin., 2007).

Además, hay esplenomegalia, pudiendo ocurrir hemorragias en el tejido gonadal. Una característica distintiva en algunos casos de la enfermedad entérica de la boca roja (EBR) es que el intestino se llena de un material de color amarillo, mucoso o acuoso y la estructura intestinal se vuelve flácida, transparente, hemorrágica, y carente de alimentos (Furones *et al.*, 1993). Hay

acumulación de líquido sanguinolento y a menudo resulta en el abdomen cada vez más distendido (Busch, 1978; Rucker, 1966).

En la actualidad, el uso de la enfermedad entérica de la boca roja, ha sido referido como "Yersiniosis" debido a que la característica más resaltante de enrojecimiento alrededor de la boca y opérculo no aparece en todos los peces afectados y muchas veces no se observa la clásica boca roja (Frerichs *et al.*, 1985; Inglis *et al.*, 1993).

2.3.6. PATOGÉNESIS

El conocimiento de la patogénesis de *Yersinia ruckeri* aún es limitado, se conoce más las patogénesis de otro tipo de bacterias del mismo género, como el de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica*, todos estos causantes de enfermedades en los seres humanos (Viboud & Bliska, 2005). En los últimos años un grupo de investigadores han tratado de revelar los mecanismos patológicos similares entre las yersinias que afectan humanos con las especies de *Yersinia ruckeri* y han investigado la presencia de factores de virulencia comunes. A pesar de que estos agentes causan diferentes signos clínicos y utilizan diferentes modos de transmisión, se han identificado varios factores de virulencia similares (Revell & Miller 2001).

Las rutas más importantes para las diversas bacterias que afectan a los peces, y condicionan una infección son las branquias, piel, intestino, todos estos órganos tienen la particularidad de encontrarse cubiertos por una capa mucosa, la cual es considerada como la primera barrera física que cruza el patógeno para dar inicio al proceso de infección, dicho mucus es importante para la defensa del hospedero, pues es considerado una barrera con actividad antibacteriana, pudiendo variar el grado de actividad entre las diferentes especies (Svendsen & Bogwald, 1997).

Y. ruckeri posee toxinas extracelulares como la proteasa Yrp1 que degrada estructuras extracelulares y la membrana basal, causando alteración de la misma y provocando la erosión de los vasos capilares y por ende microhemorragias en ciertas áreas como la boca y el intestino. Así mismo posee la hemolisina YhIA capaz de lisar los eritrocitos (Fernández *et al.*, 2003).

La *Ruckerbactin* está relacionada con la adquisición de hierro, en condiciones de carencia de hierro *in vitro*, y también durante la infección. La capacidad de obtención del hierro del medio ambiente es un requisito esencial para el desarrollo del proceso de infección por *Y. ruckeri* (Fernández *et al.*, 2004a).

2.3.7. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

2.3.7.1. TRANSMISIÓN

La transmisión de la enfermedad se produce por contacto directo del pez infectado con otro sano, por la alta cantidad de bacterias que contiene el agua proveniente de un pez infectado o portador (Rucker, 1966; Bullock *et al.*, 1976; Bullock & Cipriano, 1990). La transmisión vertical hasta ahora no ha sido demostrada y probablemente no ocurra (Dulin *et al.*, 1976). El estrés en el pez también juega un rol importante en la aparición de brotes de la enfermedad entérica de la boca roja (EBR), así se observó que peces portadores transmitieron *Y. ruckeri* a peces clínicamente sanos cuando el nivel de temperatura se elevó a 25°C, mientras que peces portadores no estresados no manifestaron dicha enfermedad. El patógeno ha sido aislado de heces de peces portadores dos meses después de un brote de la enfermedad de la EBR (Hunter *et al.*, 1980).

El modo de transmisión de *Y. ruckeri* también se ha relacionado con otros supuestos vectores tales como invertebrados acuáticos y aves (Willumsen, 1989).

Al igual que muchas especies de entornos acuáticos, *Yersinia ruckeri* también está asociado con superficies y sedimentos. Se aislaron cepas de *Y. ruckeri* que mostraron la capacidad de formar biopelículas, sobre soportes sólidos, incluyendo muchos de los materiales que comúnmente se utilizan en la cría de peces. El *biofilm* bacteriano ha demostrado ser muy resistente al ácido oxolínico, antibiótico de uso frecuente en el tratamiento de la EBR (Coquet *et al.*, 2002).

2.3.7.2. RANGO DE HOSPEDEROS

La bacteria *Yersinia ruckeri*, afecta severamente a la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), pero también se han reportado brotes en otros tipos de salmónidos como en poblaciones de trucha común o marrón, *Salmo trutta*; trucha de arroyo, *salvelinus fontinalis*; king salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*; salmón coho, *Oncorhynchus kisutch* (Dulin *et al.*, 1976), Salmón del atlántico, *Salmo salar* y salmón del pacífico (Bullock *et al.*, 1978). Algunos peces no salmónidos también han sido reportados como portadores del patógeno, como el *Channel Catfish*, *Ictalurus punctatus* (Danley *et al.*, 1999) *goldfish*, *Carassius auratus* (McArdle & Dooley-Martin, 1985). Además esta bacteria también ha afectado a algunas especies de peces marinos como, el *turbot* o rodaballo, *Scophthalmus maximus*, *Dicentrarchus labrax*, *Sparus auratus*, entre otros (Vigneulle, 1990).

2.3.7.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El rango geográfico de los aislados de *Y. ruckeri* indican que es común en peces y ambientes acuícolas, estando los brotes de la enfermedad relacionada con cultivos intensivos (Inglis *et al.*, 1993). La diseminación de esta enfermedad se debió en gran medida a la falta de programas de control, además que en el estado subclínico es altamente infecciosa y de fácil transmisión (Austin & Austin, 2007).

La enfermedad entérica de la boca roja, se encuentra extendida en diferentes países del mundo, lo podemos encontrar en países de América del Norte y de América del Sur (Ross *et al.*, 1966; Stevenson & Daly, 1982; Bravo & Kojagura, 2004), Alemania (Fuhrmann *et al.*, 1983), Italia (Busch, 1978), Irlanda (McCormick & McLoughlin, 1993), Noruega (Richards & Roberts, 1978) y Australia (Bullock *et al.*, 1978; Llewellyn, 1980). Además con el reciente aumento en el número de casos de la enfermedad, sobre todo en Europa, al parecer la enfermedad seguira propagándose (Austin & Austin, 2007).

2.3.8. DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico de la enfermedad entérica de la boca roja hay que tener varias consideraciones, como los signos clínicos en el pez enfermo y el aislamiento de la bacteria (Concha, 1998). El diagnóstico presuntivo de la enfermedad está basado en la aislamiento inicial de un bacilo Gram negativo y citocromo oxidasa negativo (Busch, 1982), generalmente motil, productor de ácido pero usualmente sin producción de gas a partir de la glucosa, descarboxila la ornitina y la lisina. Los aislados podrían dar resultados negativos para la esculina y la salicina (Bullock & Cipriano, 1990). Es conocido también la reacción cruzada con antisuero entre *Hafnia alvei* y *Yersinia ruckeri* (Stevenson & Airdrie, 1984). *H. alvei* puede ser diferenciado de *Yersinia ruckeri*, así *H. alvei* es positivo para la fermentación de la xilosa mientras *Y. ruckeri* es negativo (Buller, 2004).

Algunos autores recomiendan el uso del sistema API 20E, para la identificación de este agente, sin embargo los *test* convencionales y este sistema dan a menudo resultados variables, los mas representativos incluyen la utilización del citrato, la hidrólisis de la gelatina, Voges Proskauer, y el nitrato (Davies & Frerichs, 1989).

Para la identificación de *Yersinia ruckeri* no es muy recomendable el uso del sistema API, ya que aislados diagnosticados como *Yersinia ruckeri* mediante esta prueba, en realidad fueron la bacteria *Hafnia alvei* (Austin *et al.*, 2003, Romalde, 1991), además este sistema tampoco es recomendado por el Manual de Diagnóstico para Organismos Acuáticos (OIE, 2006).

La confirmación diagnóstica se realiza a través del uso de antisueros específicos en pruebas de aglutinación en placa y en técnicas con fluorescencia (Mc Daniel, 1979; Barja & Toranzo, 1988). Ahora también se utiliza la técnica de la reacción de cadena de polimerasa (PCR), esta técnica provee resultados más confiables y mucho más rápidos que los métodos convencionales para la detección de *Yersinia ruckeri* (Gibello *et al.*, 1999).

2.3.9. PREVENCIÓN Y CONTROL

El control de la enfermedad entérica de la boca roja (EBR) en salmónidos de cultivo se realiza a través de vacunaciones y agentes antimicrobianos, además de ello por un buen manejo y condiciones de cultivo, desafortunadamente, las vacunaciones no proporcionan un 100% de protección y el uso de antibióticos aún es necesario en algunas ocasiones (Rodgers, 1991).

La prevención y el control de la EBR en áreas donde ya esta establecido este agente, la severidad de la enfermedad se puede reducir por disminución de estrés, control de la calidad del agua y provisión de adecuadas dietas y la implementación de buenas prácticas sanitarias en la industria del cultivo de las truchas (Furones *et al.*, 1993) Sin embargo, la mejora de las condiciones en sistemas de cultivos intensivos es más difícil. Donde sea que la enfermedad entérica de la boca roja es geográficamente restringida, la prevención de una mayor diseminación debería lograrse mediante una mejor aplicación de la inspección sanitaria del pez y los procedimientos de certificación para regular los movimientos de peces y ayudar a prevenir la propagación de la enfermedad (Busch, 1983; McDaniel, 1979; Austin & Austin, 2007).

2.3.10. TRATAMIENTO y SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Varios antibióticos han sido utilizados para el control de la enfermedad entérica de la boca roja así varios estudios indican una serie de antimicrobianos que pueden ser utilizados con éxito para el tratamiento de infecciones producidas por *Yersinia ruckeri*, dentro de los cuales se encuentra el ácido oxolínico (Rodgers & Austin, 1983). El ácido nalidíxico y la flumequina son las sustancias más activas *in vitro*, junto a la oxitetraciclina, gentamicina, nitrofurantoina, tetraciclina, neomicina, cloranfenicol, clortetraciclina, eritromicina, furazolidona (Ceschia *et al.*, 1987).

También se ha observado significativas variaciones de los patrones de susceptibilidad de *Y. ruckeri* dentro del ecosistema acuícola, a medida que avanza el tiempo, hecho que se debería al uso indiscriminado de antibióticos en la terapia de esta y otras patologías (Concha, 1998).

El uso indiscriminado de antimicrobianos trae como consecuencia una serie de desventajas, se genera resistencia bacteriana, recurrencia de nuevos brotes y altos costos (De Grandis & Stevenson, 1985; Rodgers, 1991). Dentro de los errores más comunes detectados que predisponen a la aparición de cepas resistentes están los tratamientos no avalados por pruebas de sensibilidad, bajas dosis, interrupción o disminución del tiempo mínimo recomendado, errores de cálculo y el uso reiterativo de un solo tipo de antibiótico (Concha, 1998).

2.4 . CARACTERIZACIÓN GENÉTICO - MOLECULAR

2.4.1. TÉCNICAS DE GENOTIPAJE

Hasta la actualidad se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación, basadas en la técnica del PCR, representando un avance importante en el estudio de los microorganismos y siendo muy útil (Rivas *et al.*, 2006).

Los métodos de genotipaje están basados en el estudio del ADN, cromosómico o extracromosómico, comparando secuencias nucleotídicas de los microorganismos directa e indirectamente, permitiendo determinar la relación clonal entre cepas de una misma especie (Fernández, 2004b).

Para evaluar la diversidad de especies bacterianas se utilizan diversos tipos de métodos moleculares entre ellos se encuentran el ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR.

Las secuencias ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus), constan de 126 pares de bases que contienen en la parte central una repetición invertida altamente conservada y están localizadas en regiones extragénicas del genoma bacteriano (Olive & Bean, 1999). La amplificación de las secuencias ERIC mediante PCR, es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias Gram negativas (Graser *et al.*, 1993).

La REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic elements) se usa para amplificar elementos de ADN repetitivos presentes en toda la bacteria, esta técnica de tipificación, en la que se utilizan *primers* con secuencias de ADN repetidas (secuencias rep), que se encuentran distribuidas en el cromosoma de muchas enterobacterias, algunas bacterias Gram positivas y algunos hongos (Versalovic *et al.*, 1991). Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas, causadas por inserciones o deleciones de ADN (Fernández, 2004b).

En la técnica del BOX-PCR (Extragenic Repeating Elements PCR) estas secuencias están localizadas en regiones intergénicas, son conjunto de elementos repetitivos de compuestos de varias combinaciones de secuencias, consta de 154 pares de bases repetidas en el genoma bacteriano, posee tres subunidades conocidas como box A, box B y box C, las cuales constan de 59, 45, y 50 nucleótidos respectivamente (Olive & Bean, 1999).

La aplicación simultánea de REP y ERIC – PCR a muestras seleccionadas incrementan el poder de identificación (Olive & Bean, 1999). El poder de discriminación puede llegar a ser incrementado significativamente al combinar la tipificación de por ERIC, REP, BOX-PCR en un mismo estudio (Manrique, 2010).

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Aislar y caracterizar a nivel fenotípico y molecular *Yersinia ruckeri* de truchas arco iris obtenidas del centro piscícola “El Ingenio” – Huancayo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar mediante pruebas bioquímicas *Yersinia ruckeri* de peces juveniles, con o sin signos de la enfermedad entérica de la boca roja.
- Determinar el biotipo de las cepas identificadas.
- Determinar la resistencia a antibióticos de las cepas.
- Identificar y caracterizar a nivel genético molecular las cepas aisladas de *Yersinia ruckeri*.
- Determinar la similaridad entre las cepas de *Y. ruckeri*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. LUGAR DE ESTUDIO Y MUESTREO

El muestreo se realizó en el mes de octubre del 2010 en piscigranjas del Centro Piscícola “El Ingenio” ubicado a 3452 msnm, en la provincia de Huancayo de la región Junín. La evaluación microbiológica y molecular se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima.

Se muestrearon un total de 20 peces, 10 con signos clínicos de enfermedad (nado errático, melanosis de la piel, exoftalmia bilateral, descamación de piel), y 10 peces sin signos de enfermedad, todos en fase juvenil. A cada pez se le extrajo el riñón, el bazo y contenido intestinal.

4.2. PROCESAMIENTO EN EL LABORATORIO

4.2.1. NECROPSIA

Las truchas fueron sacrificadas por la técnica de corte medular y posteriormente se hizo el examen externo con la finalidad de observar algún tipo de lesión macroscópica (Figuras 4 y 5), luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol al 70%. Posteriormente se realizó la necropsia según Reimschuessel *et al.*, (1992), hasta exponer los órganos internos *in situ* y proceder a tomar una muestra.



Figura 4. Procesamiento de las truchas – necropsia – en Centro Piscícola “El Ingenio”.

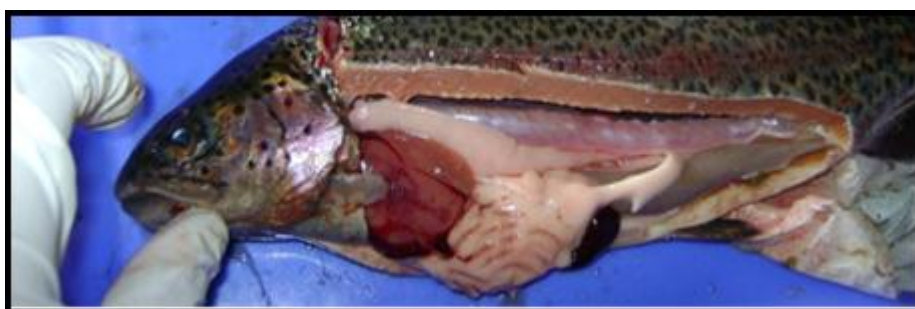


Figura 5. Exposición de los órganos internos *in situ* de *Oncorhynchus mykiss*.

4.2.2 OBTENCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Luego de realizar la necropsia, se procedió a tomar muestras, por hisopado directo del bazo, riñón y contenido intestinal para luego ser colocadas en medio Stuart y ser transportadas a la brevedad al laboratorio en Lima para su posterior análisis.

4.3. PROCESAMIENTO PARA ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

4.3.1. AISLAMIENTO BACTERIANO

Del medio de transporte conteniendo muestras de bazo, riñón y contenido intestinal, se sembró por estriado en las placas de agar MacConkey y TSA, incubándose a 22°C por 24 - 48 horas.

4.3.2. CARACTERIZACIÓN DE COLONIAS

Pasado el tiempo de incubación se procedió a la selección de las colonias en cada uno de los medios, en el Agar MacConkey, se seleccionaron las colonias circulares de entre 1 a 3 mm de diámetro, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos y lactosa negativas. En el agar TSA las colonias seleccionadas fueron las que presentaron colonias de 1 a 3 mm, redondas, lisas, ligeramente convexas y con bordes completos, blanco cremosas, presentando muchas veces un olor característico único entre las bacterias que afectan a los peces (Busch & Lingg, 1975; Austin *et al.*, 1982; Busch, 1982; Furones *et al.*, 1993).

4.4. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA PRELIMINAR

Se procedió a realizar el examen microscópico de cada aislado (TSA y Mc Conkey), utilizando tinción Gram para evaluar su morfología celular, luego se hicieron las pruebas de catalasa y de citocromo oxidasa.

4.5. MANTENIMIENTO DE CEPAS

Para la conservación de las cepas seleccionadas, cada una se sembró en agar Luria Bertani, las cuales fueron incubados a 22°C por 24 horas y guardadas hasta realizar las pruebas bioquímicas posteriores.

4.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Para la caracterización bioquímica de los aislados, se realizaron las siguientes pruebas: Prueba de Rojo de metilo (MR), descarboxilación de Lisina, arginina, ornitina, producción de hidrógeno sulfurado en SIM, degradación de gelatina, producción de ácido a partir de: glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, sorbitol, arabinosa, trehalosa, manosa, ramnosa, xilosa, maltosa, motilidad, citrato, producción de Indol, reducción de nitratos, ureasa.

Las pruebas bioquímicas fueron desarrolladas siguiendo las recomendaciones de Buller (2004), e incubadas a 22° por 24-48 horas pasado ese tiempo se procedió a la recolección de resultados.

4.7. IDENTIFICACIÓN DEL BIOTIPO

Para la identificación del biotipo se realizaron las pruebas de lipólisis del Tween 20, del Tween 80 y de la motilidad (Davies & Frerichs, 1989). Cada cepa fue sembrada en agar base Tween (Sierra, 1957), para ver la degradación en ambos sustratos. Para el caso de la motilidad se realizó un ensayo, sembrándose las cepas en agar Columbia con el 0.3% de agar e incubándose a 25°C por 24 horas (Coquet *et al.*, 2002), transcurrido el tiempo se procedió a la recolección de los resultados.

4.8. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

4.8.1. DISCOS DE ANTIBIÓTICOS PROBADOS

Los antibióticos utilizados fueron: ácido oxolínico (O), 2µg; cloranfenicol (C), 30µg; tetraciclina (Te), 30µg; sulfa-trimetropin (SXT), 25µg y amoxicilina (AMX), 25µg.

4.8.2. EVALUACIÓN DE RESISTENCIA MICROBIANA

Cada cepa en estudio fue procesada según el método de la NCCLS (2009), para la difusión de disco en agar Müller Hinton con el objetivo de evaluar la sensibilidad frente a los antibióticos.

Se cultivó cada cepa en caldo TSB incubándose a 22°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente antes de la 18 horas). Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión presionándolo sobre las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo. Luego cada suspensión bacteriana se sembró sobre la superficie seca de las placas con agar Müller-Hinton, se estrió con el hisopo en varias direcciones diferentes asegurando la distribución uniforme del inóculo, se dejó secar la placa a temperatura de ambiente por unos cuantos minutos para que el exceso de humedad sea absorbida. Posteriormente se aplicó los discos cada uno se colocó en el agar con una pinza estéril, cada placa se incubó a 22°C por 18 horas.

4.8.3. LECTURA Y ANÁLISIS DEL ANTIBIOGRAMA

Para la lectura del antibiograma, se procedió a la medición del diámetro de los halos de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco) con una regla milimetrada. El tamaño de los halos fue comparado con los realizados por diversos autores en la industria acuícola, y se siguieron las recomendaciones de Smith (2006), interpretando como sensible, intermedio o resistente.

4.9. PROCESAMIENTO PARA ANÁLISIS MOLECULAR

4.9.1. EXTRACCIÓN DEL ADN

a) Preparación de células

Las cepas de *Yersinia spp* se cultivaron en caldo Luria Bertani por 24 horas a 22°C, 2mL del cultivo se depositaron en tubos para microcentrífuga, centrifugando a 13000 x g por 3 minutos, sedimentando de esa manera las células, luego se removiò el sobrenadante dejando el precipitado bacteriano lo más seco posible. Se realizó 2 lavados al precipitado, agregándole 200 µL de agua bidestilada estéril, homogenizando en vórtex y centrifugando a 13000 x g por 2 minutos.

b) Lisis de las Células

Para el lisado de las células bacterianas se agregó una solución de 200 µL de resina Chelex 100 (SIGMA) al 5% (De Lamballerie *et al.*, 1992) al precipitado

bacteriano, homogenizando el precipitado con el Chelex en un vórtex, y se llevó a baño maría a 100°C por 8 – 10 minutos para lisar las células.

c) Recuperación del ADN

El lisado se centrifuga a 13000 x g por 5 minutos, recuperando el ADN. Se cogió 100 µL del sobrenadante depositándolo en un tubo nuevo, se almacenó a -20C° hasta su uso.

4.10. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS

4.10.1. IDENTIFICACIÓN DE *Yersinia ruckeri*

La identificación molecular de *Yersinia ruckeri* se realizó por la técnica del PCR (reacción en cadena polimerasa), en la cual se amplificó una secuencia específica del gen RNAr 16S, con un tamaño de 575 pb. Los iniciadores utilizados para esta identificación fueron el YER8 (forward: 5'-GCGAGGAGGAAGGGTTAAGTG-3') y el YER10 (reverse: 5'-GAAGGCACCAAGGCATCTCTG-3'), los cuales son los más utilizados para la identificación de este patógeno, además de ser bastante específicos (Gibello *et al.*, 1999). Para el desarrollo de la técnica se preparó un master mix (Tabla 4) y a cada uno se le agregó 1µL de ADN extraído, además se le agregó 1µL de agua destilada estéril a un microtubo, como control negativo, y se agregó 1µL de ADN de muestra patrón (*Y. ruckeri* 150), como control positivo.

Tabla 4. Componentes del *master mix* para la identificación de *Yersinia ruckeri* en un volumen de reacción total de 20 µL

Reactivos Stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción
H ₂ O ultrapura		9,3 µL
Buffer 10x	1x	2 µL
MgCl ₂ 25mM	2 mM	1,6 µL
dNTPs 2,5mM	0,2 mM	1,6 µL
Primer F:YER 8 10 µM	1 µM	2 µL
Primer R: YER 10 10 µM	1 µM	2 µL
Taq Polimerasa 1U/ µl	0,5 U	0,5 µL
ADN de la muestra		1 µL
Volumen Final		20 µL

Para la amplificación se usó el siguiente programa

92°C x 1 min (D.I.)	
92°C por 2 min (D)	
55°C por 30 seg (H)	} 25 ciclos
72°C por 1 min (E)	
72°C por 5 min (E.F.)	

D.I: desnaturalización inicial, D: desnaturalización, H: Hibridación, E: extensión, E.F: extensión final

4.10.2. ELECTROFORESIS

Para la electroforesis se utilizó agarosa al 1%, buffer de carga (SDS 0,5%, glicerol 25%, EDTA 25mM, azul de bromofenol 0,05%, agua bidestilada), buffer TAE 0,5x (Tris acetato EDTA), el marcador molecular *Mass Ruler ADN ladder #SM0403* (Fermentas) y bromuro de etidio al 0,01%. La corrida electroforética se realizó por 40 minutos a 80 V.

4.11. CARACTERIZACIÓN GENÉTICO - MOLECULAR

Para la caracterización genético molecular se utilizaron los siguientes iniciadores:

4.11.1. ERIC –PCR

Para establecer la relación entre las cepas identificadas como *Yersinia ruckeri* se amplificó las secuencias *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC); ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), de acuerdo a lo reportado por Versalovic *et al.*, (1991) con modificaciones en las concentraciones del master mix (Tabla 5). Los amplificados se analizaron mediante el software *Bionumerics* (Applied Maths, USA), para construir un dendrograma y determinar la similaridad entre las cepas.

Tabla 5. Componentes para ERIC - PCR para un volumen de reacción total de 25 µL

Reactivos Stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción
H ₂ O ultrapura		9 µL
Buffer 10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂ 25mM	4 mM	4 µL
dNTPs 2,5mM	0,2 mM	2 µL
Primer F: ERIC 1 10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Primer R: ERIC2 10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Taq Polimerasa 1U/ µl	2 U	2 µL
ADN		3 µL
Volumen Final		25 µL

Para el ERIC-PCR se uso el siguiente programa

94°C por 5 min (D.I.)	
94°C por 30 seg (D)	} 8 ciclos
38°C por 1 min (H)	
72°C por 2 min (E)	

94°C por 30 seg (D)	} 25 ciclos
42°C por 1 min (H)	
72°C por 2 min (E)	

72°C por 7 min (E.F.)

D.I: desnaturalización inicial, D: desnaturalización, H: Hibridación, E: extensión,
E.F: extensión final.

Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE, por 1 hora a 60V.

4.11.2. REP –PCR

Para establecer la relación entre las cepas identificadas como *Yersinia ruckeri* también se utilizó la amplificación por PCR de elementos Palindrómicos Extragénicos Repetitivos (REP), con modificaciones en las condiciones de amplificación. Los amplificados se analizaron mediante el *software Bionumerics* (Applied Maths, USA), para construir un dendrograma y determinar la similaridad entre las cepas (Tabla 6).

Tabla 6. Componentes para REP-PCR para un volumen de reacción total de 25 µL

Reactivos Stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción
H ₂ O ultrapura		9 µL
Buffer 10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂ 25mM	4 mM	4 µL
dNTPs 2,5mM	0,2 mM	2 µL
Primer F: REP1 10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Primer R: REP2 10 µM	0,5 µM	1,25 µL
Taq Polimerasa 1U/ µl	2 U	2 µL
ADN		3 µL
Volumen Final		25 µL

Para el REP-PCR se uso el siguiente programa:

94°C por 5 min (D.I.)
 94°C por 30 seg (D)
 38°C por 1 min (H)
 72°C por 2 min (E) } 8 ciclos

94°C por 30 seg (D)
 42°C por 1 min (H)
 72°C por 2 min (E) } 25 ciclos

72°C por 7 min (E.F.)

D.I: desnaturalización inicial, D: desnaturalización, H: Hibridación, E: extensión, E.F: extensión final.

Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE, por 1 hora a 60V.

4.11.3. BOX –PCR

Para establecer las secuencias repetitivas de elementos extragénicos en el genoma de las cepas identificadas como *Yersinia ruckeri* se utilizó la amplificación con iniciadores BOX: la estandarización de las condiciones de amplificación y las condiciones del *Master Mix* se exponen en la Tabla 7. Los amplificadores se analizaron mediante el software Bionumerics (Applied Maths, USA), para construir un dendrograma y determinar la similaridad entre las cepas.

Tabla 7. Componentes para BOX - PCR para un volumen de reacción total de 25 µL

Reactivos Stock	Concentración por reacción	Volumen por reacción
H ₂ O ultrapura		9,25 µL
Buffer 10x	1x	2,5 µL
MgCl ₂ 25mM	4 mM	4 µL
dNTPs 2,5mM	0,3 mM	3 µL
PrimerBOX: 10µM	0,5 µM	1,25 µL
Taq Polimerasa 1U/ µl	2 U	2 µL
ADN		3 µL
Volumen Final		25 µL

Para el BOX-PCR se uso el siguiente programa:

95°C por 7 min (D.I.)	
95°C por 5 min (D)	} 4 ciclos
40°C por 5 min (H)	
72°C por 5 min (E)	
94°C por 1 min (D)	} 30 ciclos
55°C por 1 min (H)	
72°C por 2 min (E)	
72°C por 10 min (E.F.)	

D.I: desnaturalización inicial, D: desnaturalización, H: Hibridación, E: extensión, E.F: extensión final.

Los resultados de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% en buffer TAE, por 1 hora a 60V.

4.12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Para el análisis de las bandas obtenidas con las técnicas usadas para el genotipaje, se utilizó la herramienta bioinformática Bionumerics versión 6.6 (Applied Maths, USA), a partir de las fotos del gel, en donde se había realizado la corrida electroforética de las bandas de cada técnica de genotipaje (ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR), permitiendo crear dendrogramas aplicando el coeficiente de Pearson y el método de agrupación UPGMA (Unweighted Pair Group Method), los cuales permitieron agrupar y establecer relaciones entre las cepas aisladas.

V. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

Se obtuvieron un total de 343 aislados, los cuales presentaban características similares a las descritas para *Y. ruckeri*, presentando colonias circulares blanco cremosas, de entre 1 a 3 mm de diámetro (Figura 6). Del total de los aislados 109 fueron bacterias cocobacilares Gram negativas, catalasa positiva y oxidasa negativo, de ellas 34 presentaron comportamiento bioquímico similar a la señalada para *Yersinia spp*, con las siguientes pruebas bioquímicas: citrato, rojo de metilo, motilidad, producción de hidrogeno sulfurado, descarboxilación de lisina y producción de Indol (Tabla 8) (FAO, 1982).

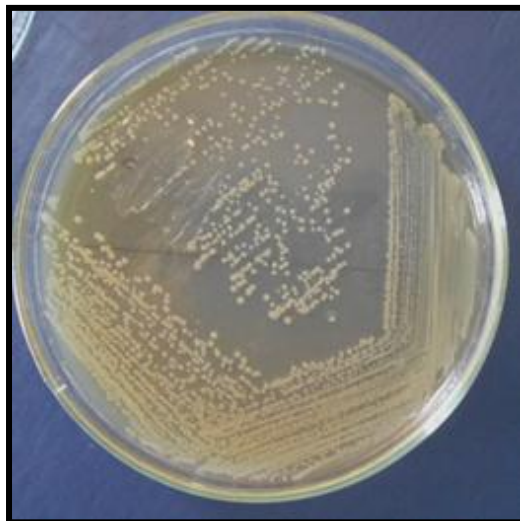


Figura 6. Colonias de *Yersinia ruckeri* en Agar TSA. Se observa colonias circulares de 1-3 mm de diámetro, blanco cremosas.

Tabla 8. Número de aislados y cepas presuntivas del Género *Yersinia*

Total de aislados	Total de cepas presuntivas, Gram(-) catalasa(+) y oxidasa(-)	Total de cepas presuntivas con IMViC test
343	109	34
100%	31,78%	9,91%

De las 34 cepas seleccionadas como *Yersinia* por pruebas bioquímicas, 19 provenían de peces sin sintomatología y 15 provenían de peces con sintomatología (Tabla 9), a cada cepa se le asignó un código, que consistió en colocarle el número de aislado y la procedencia, E: de peces con signos de la EBR y S: de peces sin signos de la EBR.

Tabla 9. Cepas presuntivas de *Yersinia ruckeri* según fuente de aislamiento.

Total Cepas presuntivas de <i>Yersinia ruckeri</i>	A partir de PCBR	A partir de PSBR
34	15	19
100%	44,12%	55,88%

PCBR: Peces con sintomatología de Enfermedad entérica de la boca roja.

PSBR: Peces sin sintomatología de Enfermedad entérica de la boca roja.

De las cepas provenientes de peces sin sintomatología de la EBR se obtuvo el siguiente resultado, todas presentaron metabolismo fermentativo para la glucosa, manitol y la manosa, ninguna cepa fermentó la lactosa, y presentaron resultados variables para los demás azúcares, para la prueba de

reducción de nitratos todas las cepas resultaron positivas, ninguna cepa metabolizó la úrea, todas las cepas descarboxilaron la lisina, sin embargo en la prueba de la arginina y la ornitina hubo resultados variables (Tabla 10).

Para el caso de las cepas provenientes de peces con sintomatología de la EBR se obtuvo lo siguiente: todas presentaron metabolismo fermentativo para la glucosa, para el manitol la mayoría resultó positiva, ninguna cepa fermentó la lactosa, la cepa 20E fue la única que fermentó la sacarosa, ninguna de las cepas fermentó el sorbitol, la cepa 21E fue la única que fermentó la arabinosa, trehalosa, las cepas 14E y 21E fueron las únicas que fermentaron la manosa y la xilosa sin embargo la cepa 1E también fermentó la manosa, ninguna cepa fermentó la ramnosa, la mayoría de las cepas no fermentaron la maltosa excepto las cepas 20E, 21E, todas las cepas dieron reacción positiva al nitrato, solo la cepa 21E metabolizó la úrea, todas las cepas resultaron positivos para la prueba de la lisina y la ornitina, en cambio para la arginina la cepa 12E y 21E dieron resultados positivos (Tabla 11).

Tabla 10. Resultados de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas a partir de Peces sin Sintomatología de la EBR.

Pruebas Bioquímicas	Cepas aisladas a partir de peces sin Sintomatología de la EBR															
	1S	2 S	3 S	4 S	5 S	7 S	8 S	9 S	10 S	12 S	13 S	15 S	16 S	17 S	18 S	19 S
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Motilidad en SIM	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de Gelatina	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Fermentación de:																
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Sorbitol	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
Arabinosa	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Xilosa	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo; 1S – 19S: código de cepas aisladas de peces sin sintomatología de EBR

Tabla 11. Resultados de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas a partir de Peces con Sintomatología de la EBR.

Pruebas Bioquímicas	Cepas aisladas a partir de peces con Sintomatología de la EBR													
	1 E	2 E	3 E	4 E	11 E	12 E	14 E	15 E	16 E	17 E	18 E	19 E	20 E	21 E
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rojo Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad en SIM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
Producción de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Degradación de : Gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Fermentación de: Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Trehalosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Manosa	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positivo; -: negativo; 1E - 21E: código de cepas aisladas de peces con sintomatología de EBR

5.2. CARACTERIZACIÓN DEL BIOTIPO

Todas las cepas identificadas como *Yersinia ruckeri*, hidrolizaron Tween 20, Tween 80, y evidenciaron motilidad (Figura 7), permitiendo agruparlas dentro del biotipo 1 (Davies & Frerichs, 1989).

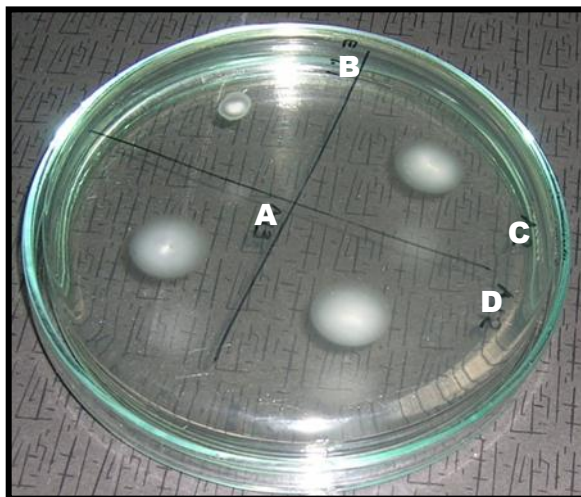


Figura 7. Migración de *Yersinia ruckeri* en el ensayo de motilidad según, Coquet *et al.* (2002). El diámetro se incrementa (A, B, C, D), evidenciando motilidad.

5.3. RESISTENCIA ANTIBIÓTICA

De las 34 cepas seleccionadas como *Yersinia spp.*, se observó el siguiente resultado para las pruebas de sensibilidad a antibióticos de las cepas aisladas de peces con sintomatología de la EBR: 4 cepas resultaron resistentes a ácido oxolínico (26,7%), 2 cepas fueron resistentes al cloranfenicol (13,3%), 4 cepas resistentes a la tetraciclina (26,7%), solo una cepa fue resistente al sulfa-trimetropin (6,8%) y 3 cepas fueron resistentes a la amoxicilina (20,0%) (Tabla 12). Para el caso de cepas provenientes de peces sin sintomatología de la EBR se obtuvo lo siguiente: 2 cepas fueron resistentes al ácido oxolínico (10,5%), 1 cepa al cloranfenicol (5,3%), 3 cepas resistentes a la tetraciclina (15,8%), solo una cepa fue resistente al sulfa-trimetropin (5,3%) y 4 cepas fueron resistentes a la amoxicilina (21,1%) (Tabla 13). De los resultados obtenidos se puede mencionar que el sulfa-trimetropin es el antibiótico que mejor resultado tiene para el control de estas cepas.

Tabla 12. Evaluación de la Resistencia y Susceptibilidad antibiótica de cepas provenientes de peces con sintomatología de la EBR.

Peces con sintomatología de la EBR				
	CR	%	CS	%
A. Oxolínico	4	26,67	11	73,33
Cloranfenicol	2	13,33	13	86,67
Tetraciclina	4	26,67	11	73,33
Sulfa-trimetropin	1	6,67	14	93,33
Amoxicilina	3	20,00	12	80,00
		18,67		81,33
Total cepas	15		100%	

CR: cepas resistentes CS: cepas sensibles %: porcentaje

Tabla 13. Evaluación de la Resistencia y Susceptibilidad antibiótica de cepas provenientes de peces sin sintomatología de la EBR.

Peces sin sintomatología de la EBR				
	CR	%	CS	%
A. Oxolínico	2	10,53	17	89,47
Cloranfenicol	1	5,26	18	94,74
Tetraciclina	3	15,79	16	84,21
Sulfa-trimetropin	1	5,26	18	94,74
Amoxicilina	4	21,05	15	78,95
		11,58		88,42
Total cepas	19		100%	

CR: cepas resistentes CS: cepas sensibles %: porcentaje

Tabla 14. Número de cepas multiresistentes.

Antibióticos	Número Cepas
O ^r , AMX ^r , C ^r , Te ^r	2
O ^r , C ^r , Te ^r , SXT ^r	1
O ^r , AMX ^r , Te ^r ,	1
Total cepas	4

O^r: ácido oxolínico resistente, AMX^r: amoxicilina resistente,
C^r: cloranfenicol resistente, Te^r: tetraciclina resistente,
SXT^r: sulfa-trimetropin resistente.

5.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *Yersinia ruckeri*

De las 34 cepas presuntivas de *Yersinia ruckeri* a través de las pruebas bioquímicas, 30 fueron confirmadas como *Yersinia ruckeri*, por el método de PCR, al amplificarse en cada una de ellas un fragmento de 575 pares de bases (Figuras 8 y 9).

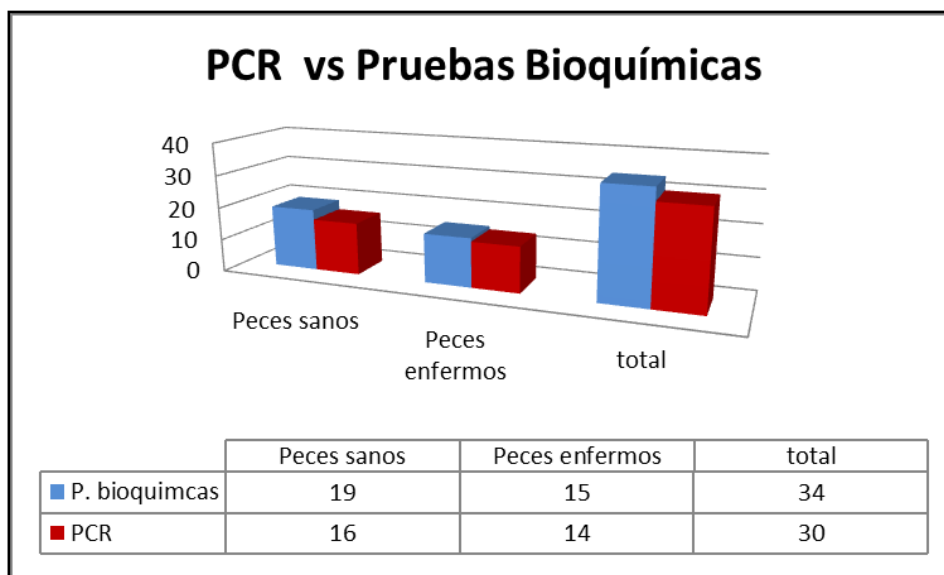


Figura 8. Comparación de la identificación de *Yersinia ruckeri* a través de pruebas bioquímicas y PCR

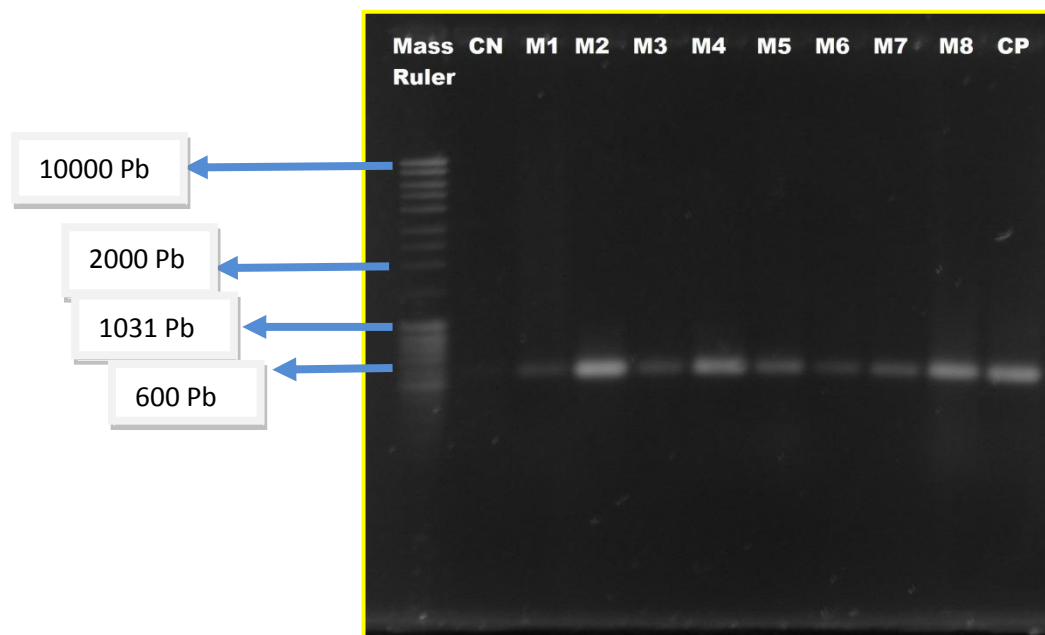


Figura 9. Amplificados gen RNAr 16S de *Yersinia ruckeri*

M: Mass Ruler, C.N: Control Negativo (*Escherichia coli*), M1-M4: Muestras Peces sin Sintomatología (cepa 4S, 7S, 16S y 18S respectivamente), M5-M8: Muestras Peces con Sintomatología (cepa 1E, 12E, 17E y 20E respectivamente), C.P: Control Positivo (*Yersinia ruckeri* 150)

De las 30 cepas confirmadas como *Yersinia ruckeri* se obtuvo el siguiente porcentaje de aislamiento según órgano; así en el caso de las cepas obtenidas a partir de peces sin sintomatología se obtuvieron siete solo en intestino, ninguna se aisló del bazo y nueve cepas solo en riñón (Figura 10). Para el caso de cepas obtenidas a partir de peces con sintomatología se obtuvieron dos cepas a partir del intestino, siete cepas solo de bazo y cinco cepas solo de riñón (Figura 11).

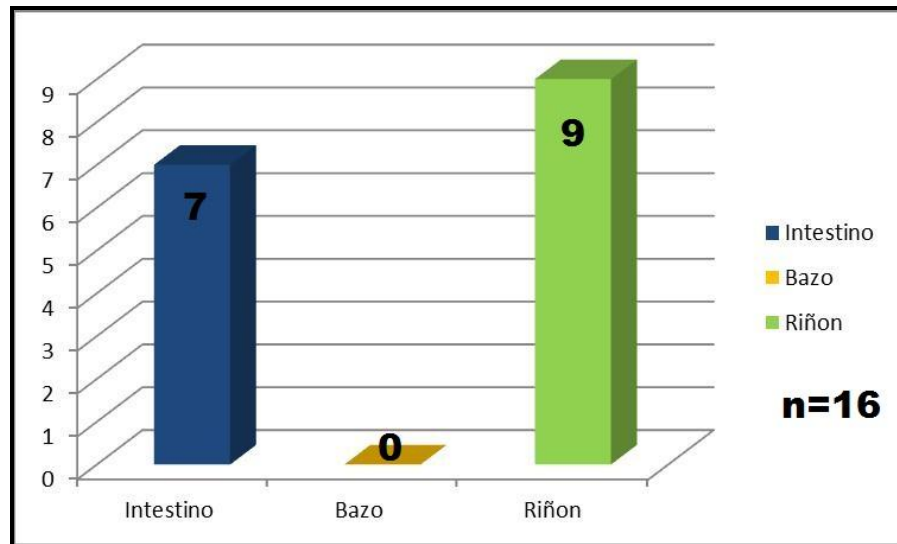


Figura 10. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas según órgano, obtenidas de peces sin sintomatología de EBR. Se aislaron 7 cepas del intestino, 9 del riñón y ninguna del bazo.

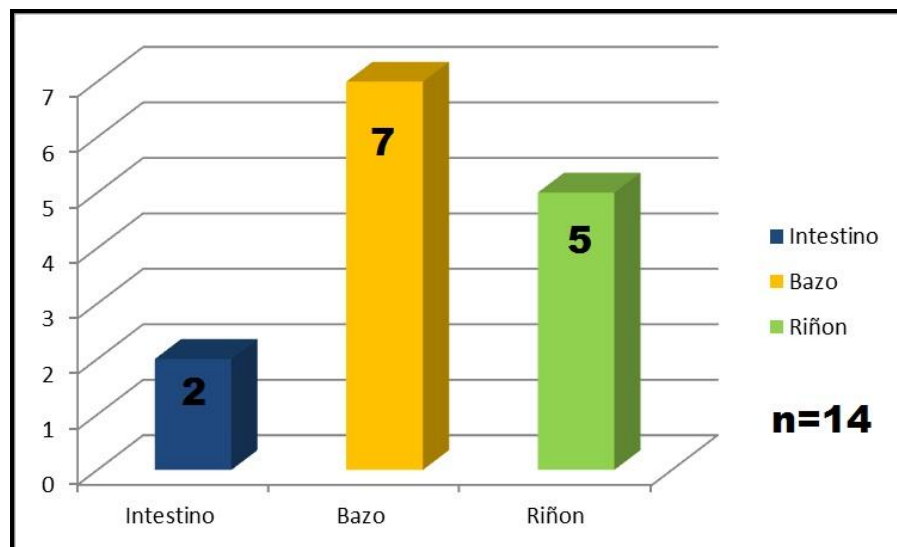


Figura 11. Número de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas según órgano, obtenidas de peces con sintomatología de EBR. Se aislaron 2 cepas del intestino, 5 del riñón y 7 del bazo.

5.5. CARACTERIZACIÓN GENÉTICO - MOLECULAR

5.5.1. ERIC-PCR

Mediante el análisis de genotipaje basado en la técnica del ERIC- PCR, se obtuvieron 4 *clusters* (Figura 12). El número de bandas para cada perfil estuvo en el rango de 3 a 16 bandas. En general se observaron diversas agrupaciones, encontrándose que las cepas de igual procedencia se agrupaban entre sí, así las cepas provenientes de peces con sintomatología de enfermedad se agrupaban entre sí y las cepas provenientes de peces sin sintomatología de enfermedad también se agrupaban entre ellas. Sin embargo hubo una única excepción, la cepa 12, proveniente de peces sin sintomatología y la cepa 4 proveniente de peces con sintomatología formaron un único grupo, con un índice de similitud mayor a 55% (Figura 12).

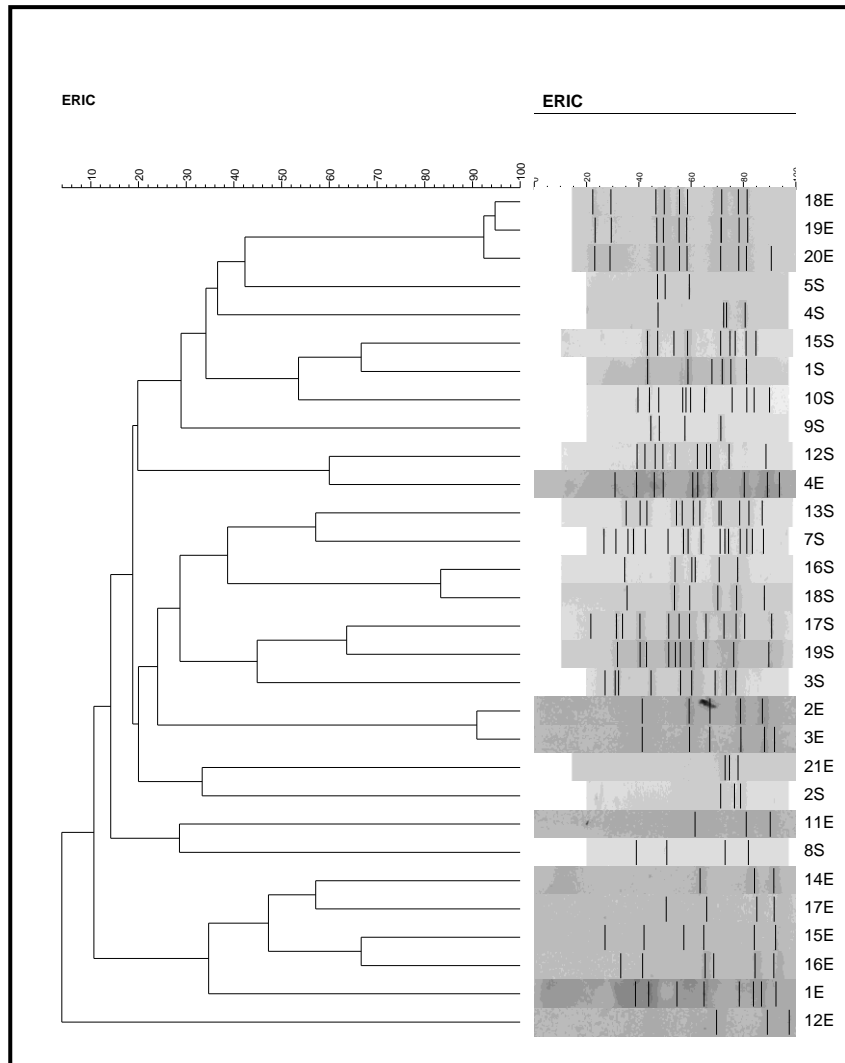


Figura 12. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ERIC-PCR, para determinar la clonalidad de las cepas de *Yersinia ruckeri*, cuya similitud fue evaluada mediante el coeficiente de Pearson, utilizando el programa *Bionumerics*. La técnica del ERIC-PCR es una herramienta de genotipificación que nos permite estudiar la relación clonal de estas bacterias.

5.5.2. REP-PCR

Mediante la técnica del REP-PCR, se obtuvieron 4 *clusters* (Figura 13). El número de bandas para cada perfil estuvo en el rango de 2 a 18 bandas, sin embargo 2 cepas no se ubicaron dentro de los 4 *clusters* anteriormente mencionados, la cepa 10 proveniente de peces sin sintomatología y la cepa 12 proveniente de peces con sintomatología. En general se observaron diversas agrupaciones, encontrándose que las cepas de igual procedencia se ubicaron en un mismo grupo, así las cepas provenientes de peces con sintomatología de enfermedad se agrupaban entre sí y las cepas provenientes de peces sin sintomatología de enfermedad también se agrupaban entre ellas. La cepa 16 aislada de peces con sintomatología de enfermedad formó un grupo con la cepa 5 aislada de peces sin sintomatología de enfermedad con un índice de similitud mayor a 58% (Figura 13).

5.5.3. BOX-PCR

Mediante la técnica del BOX-PCR, se obtuvieron 4 *clusters* (Figura 14). El número de bandas para cada perfil estuvo en el rango de 1 a 13 bandas. En general se observaron diversas agrupaciones, encontrándose que las cepas de igual procedencia se ubicaron en un mismo grupo, así las cepas provenientes de peces con sintomatología de enfermedad se agrupaban entre sí y las cepas provenientes de peces sin sintomatología de enfermedad también se agrupaban entre ellas.

Sin embargo, hubieron dos grupos formado por cepas de diferente procedencia, la cepa 12 aislada a de peces con sintomatología de enfermedad formó un grupo con la cepa 17 aislada de peces sin sintomatología de enfermedad, el índice de similaridad de este grupo fue de mayor a 35%, y el otro grupo conformado por la cepa 21 procedente de peces con sintomatología de enfermedad y la cepa 9 proveniente de peces sin sintomatología de enfermedad, con un índice de similitud mayor al 50% (Figura 14).

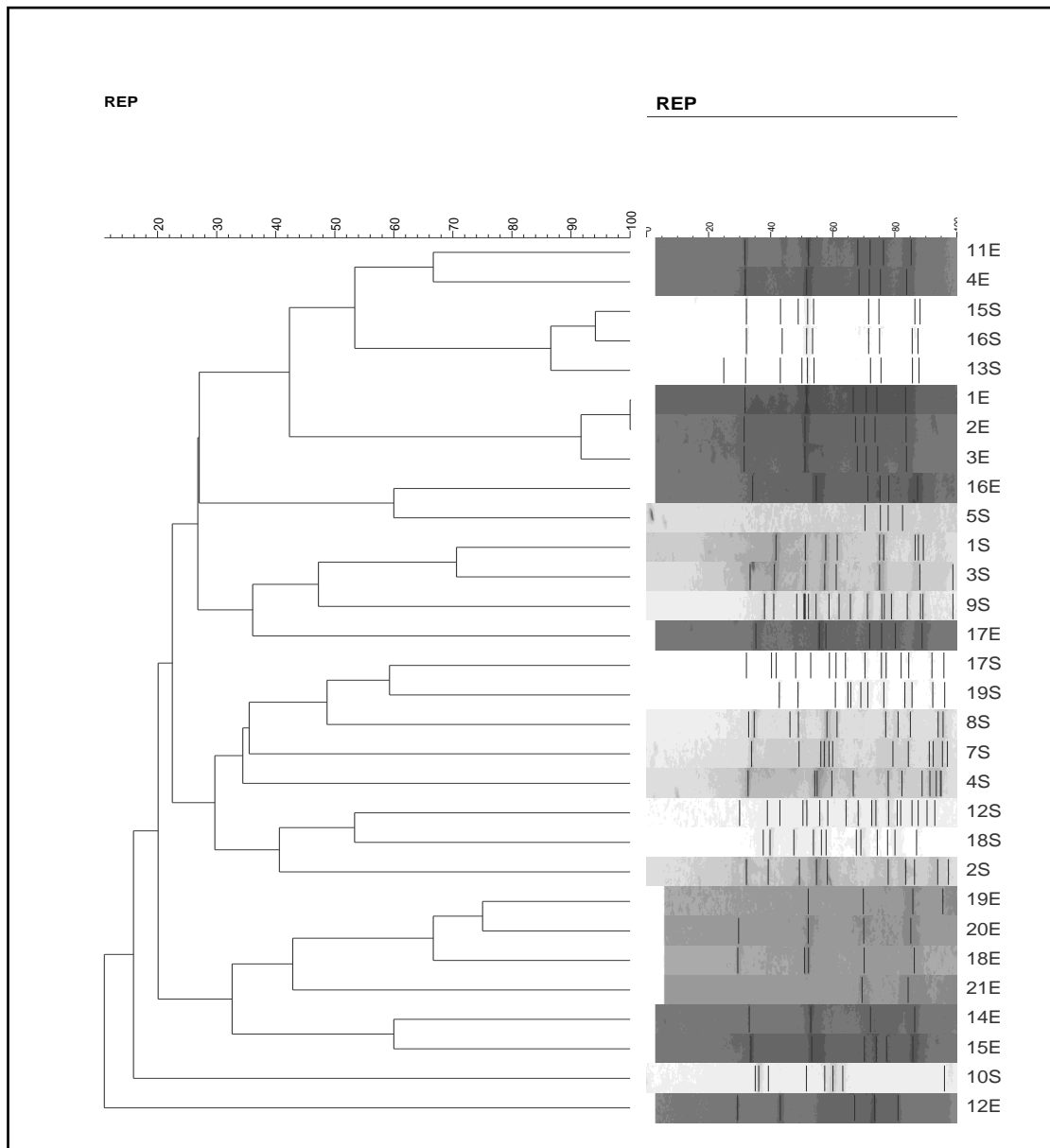


Figura 13. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante REP-PCR, para determinar la clonalidad de las cepas de *Yersinia ruckeri*, cuya similaridad fue evaluada mediante el coeficiente de Pearson, utilizando el programa Bionumerics. La técnica del REP-PCR es una herramienta de genotipificación que se utiliza para amplificar elementos de ADN repetitivos presentes en toda la bacteria.

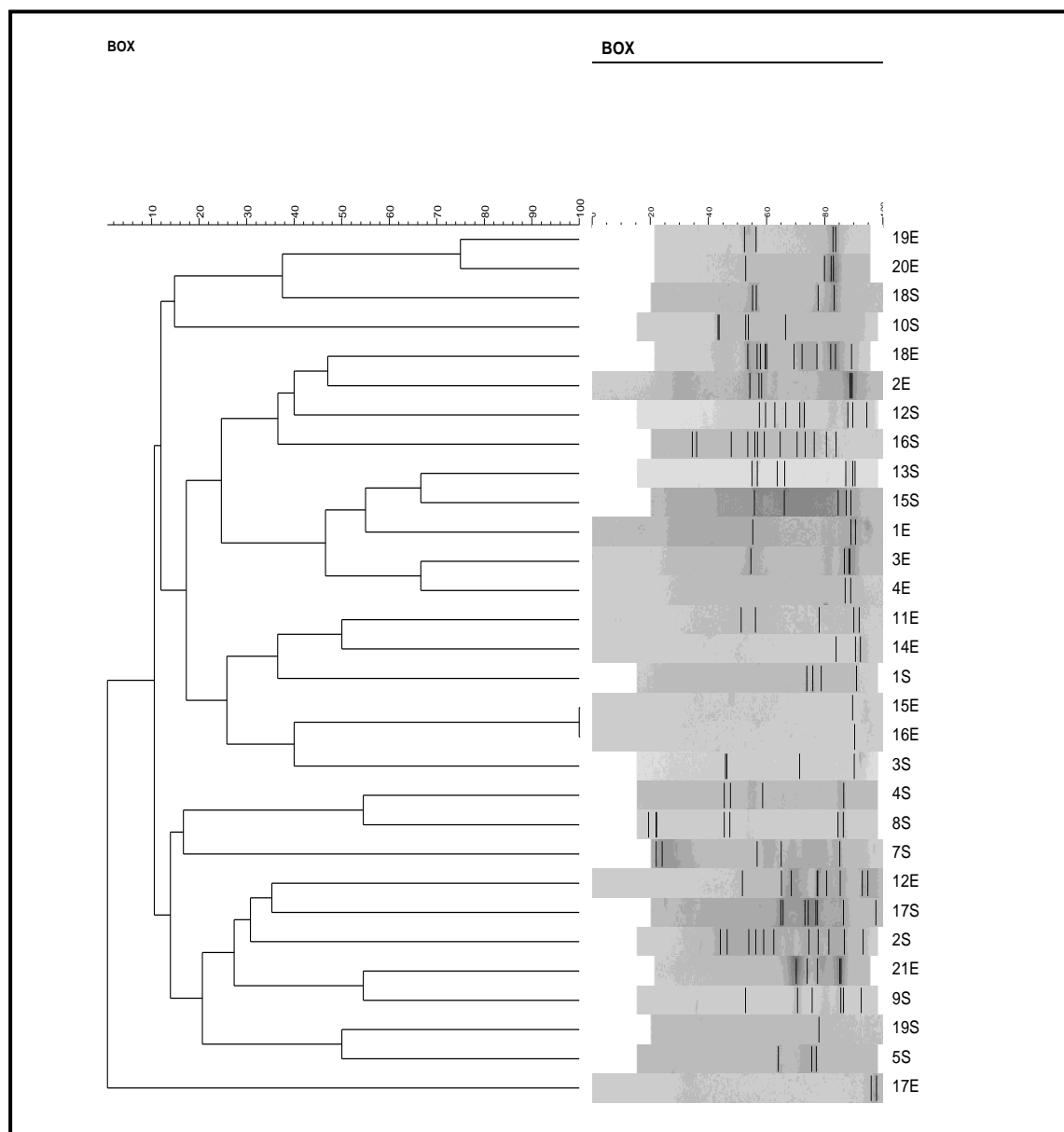


Figura 14. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante BOX-PCR, para determinar la clonalidad de las cepas de *Yersinia ruckeri*, cuya similaridad fue evaluada mediante el coeficiente de Pearson, utilizando el programa Bionumerics. La técnica del BOX-PCR es una herramienta de genotipificación que nos permite amplificar secuencias localizadas en regiones intergénicas.

Finalmente se realizó un consolidado con las tres técnicas de genotipaje (ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR), en la cual se obtuvieron 3 *clusters* con un índice de similitud mayor al 25%, al igual que en los resultados obtenidos individualmente para cada técnica de genotipaje, se mantiene la formación de grupos de igual procedencia, las cepas provenientes de peces con sintomatología de enfermedad se agrupan entre ellas y las cepas provenientes de peces sin sintomatología de enfermedad se agrupan entre ellas. Sin embargo, en este consolidado final hay la presencia de un único grupo conformado por dos cepas de diferente procedencia, la cepa 16 obtenida a partir de peces con sintomatología de enfermedad con la cepa 5 obtenida a partir de peces sin sintomatología de enfermedad, la cual tiene un índice de similitud de mayor a 60% (Figura 15).

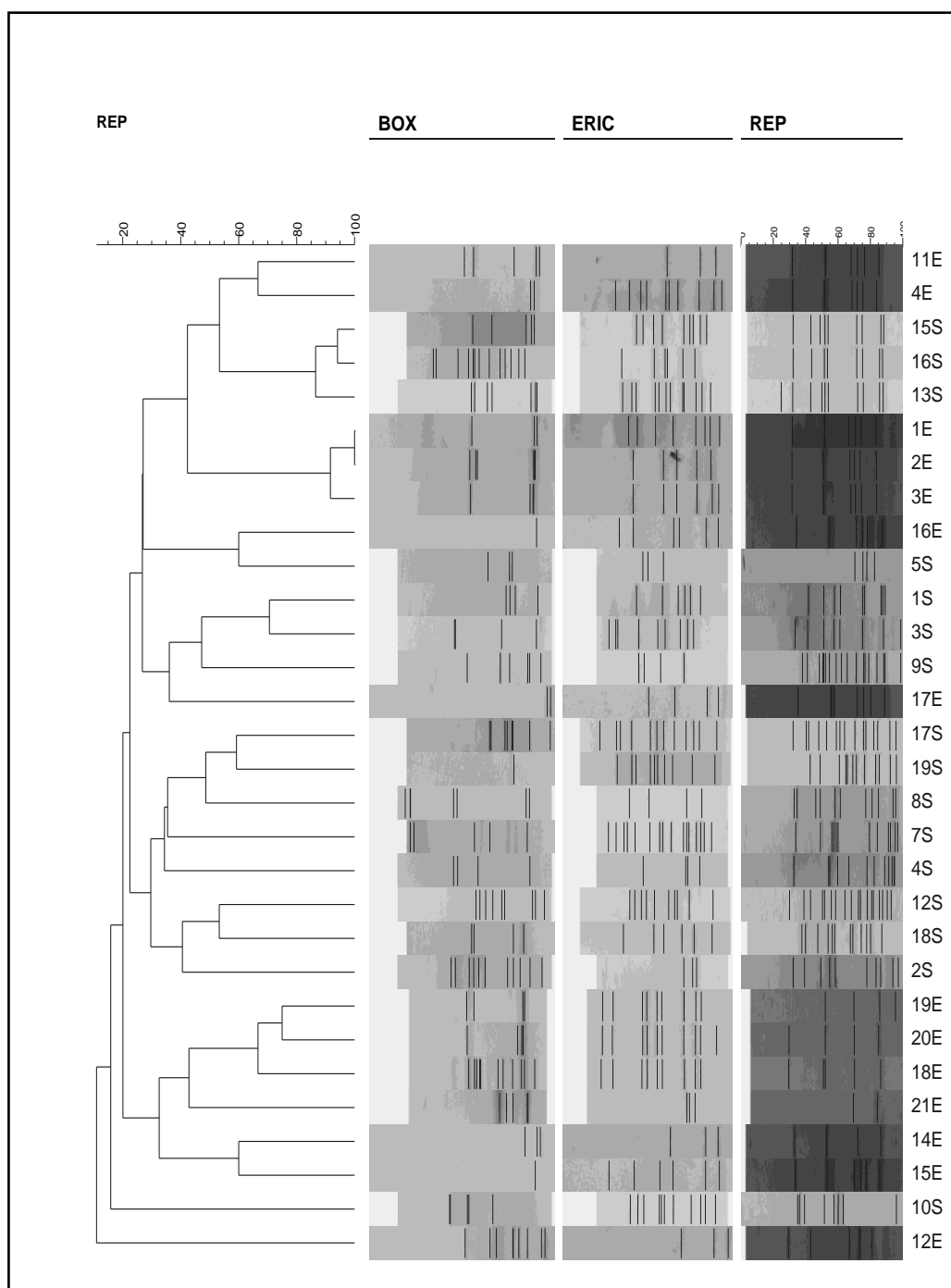


Figura 15. Dendrograma basado en el análisis de los patrones de bandas obtenidos mediante ERIC, REP, BOX - PCR, para determinar la clonalidad de las cepas de *Yersinia ruckeri*, cuya similaridad fue evaluada mediante el coeficiente de Pearson, utilizando el programa *Bionumerics*.

VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten entender mejor la etiología de la Yersiniosis y el rol que cumple *Yersinia ruckeri* en asociación con su hospedero (trucha arco iris) tanto en aquellos peces que presentan signos y síntomas de la enfermedad así como los que no los presentan.

En el grupo de los peces con sintomatología de enfermedad, solo uno de ellos presentaba el signo característico de la boca roja, hecho que se asemeja a lo reportado por varios autores (Concha, 1998; Sanchez, 2010; Sierralta, 2011).

La técnica para aislar a la bacteria *Y. ruckeri* fue la recomendada por diversos autores (Buller, 2004), en la presente investigación se utilizaron 2 tipos de medios de cultivo, se utilizó el agar tripticasa de soja (TSA) y el agar MacConkey, para tener mayor éxito en el aislamiento de *Yersinia ruckeri*, logrando aislar cepas en ambos medios, esto concuerda con lo reportado por autores como Ewing *et al.*, (1978) quienes reportan el crecimiento del 100% de estas bacterias en los medios de cultivo utilizados en la presente investigación.

Las cepas provenientes de peces sin sintomatología evidenciaron un comportamiento homogéneo para las siguientes pruebas; oxidasa, catalasa, producción de hidrógeno sulfurado, producción de indol, fermentación de la glucosa, manosa, manitol, lactosa, maltosa, úrea, reducción de nitrato, descarboxilación de la lisina; todos los resultados de estas pruebas coinciden con los reportes de Ewing *et al.*, (1978) y por Davies & Frerichs (1999).

Cabe resaltar que para otras pruebas hubo un resultado más variable, así la mayoría de las cepas evidenciaron reacción positiva para la prueba del rojo de metilo, pero un 13% reaccionó negativamente ante esta prueba, coincidiendo con los reportes de Davies & Frerichs (1999). Para el caso de la degradación del citrato, se obtuvo que un 75% resultó positivo, lo que se asemeja a lo reportado por Ewing *et al.* (1978), quien obtiene más cepas positivas mientras mayor es el tiempo de incubación lo cual se asemeja a lo reportado en el presente estudio, pues las cepas fueron incubadas por sólo 48 horas antes de la lectura; es probable, a la luz de los resultados de Ewing que el otro 25% también podrían haber dado resultados positivos para esta prueba. Para el caso de la licuefacción de la gelatina se encontró un resultado compartido de 50%,

esto se relaciona a lo reportado por Furones *et al.* (1993), quienes obtienen resultados variables para esta prueba. En el caso de la fermentación de la arabinosa, ramnosa, xilosa, sacarosa, trehalosa, se obtuvieron resultados variables tanto positivos como negativos coincidiendo con lo reportado por diversos autores (Ewing *et al.*, 1978; Furones *et al.*, 1993; Akhlaghi & Sharifi, 2008; Buller, 2004; Sierralta, 2011). La fermentación del sorbitol, según el reporte de Cipriano *et al.*, (1986) es una característica que está asociada con brotes de la enfermedad entérica de la boca roja, además también es una prueba que permite diferenciarla de la cepa original aislada en Idaho, la cual no fermenta el sorbitol, así también se ha descrito que las cepas que no fermentan el sorbitol son virulentas para peces y aquellas que la fermentan son avirulentas (Concha, 1998). En el presente estudio se obtuvo cepas fermentadoras de sorbitol y otras que no lo fermentaban, asociados a peces sin sintomatología, en cambio las cepas provenientes de peces sintomáticos ninguna fermentó este azúcar lo cual es coincidente con las investigaciones antes mencionadas.

Para el caso de los resultados obtenidos de las cepas aisladas a partir de peces con sintomatología de enfermedad también se obtuvieron resultados variables; dentro de los cuales la pruebas de rojo de metilo, motilidad, producción de hidrógeno sulfurado, indol, fermentación de glucosa, lactosa, sorbitol, ramnosa, reducción de nitratos, las pruebas de arginina y ornitina, todas las cepas tuvieron resultados coincidentes en un 100% para estas pruebas, lo que guarda semejanza con otros resultados obtenidos por diversos autores (Ewing *et al.*, 1978; Davies & Frerichs, 1999; Buller, 2004). Para el caso de las otras pruebas realizadas, las cepas obtenidas evidenciaron un metabolismo variable para el citrato con un 57% de resultados positivos, lo que guarda relación con lo reportado por Ewing *et al.*, (1978) quienes presentan resultados hasta 7 días de incubación, en la cual obtienen casi la totalidad de resultados positivos, con ello se podría presumir que las cepas de la presente investigación, podrían dar resultados positivos en su totalidad, pero como se indicó anteriormente esta prueba fue realizada con incubación por 48 horas, pasado ese tiempo se procedió a tomar dato de los resultados; en el caso de la licuefacción de la gelatina la mayoría de las cepas la degradaron lo cual guarda relación con lo obtenido por Ewing *et al.*, (1978) y Furones *et al.*, (1993); para la fermentación de la trehalosa, sacarosa, arabinosa, maltosa, manosa, xilosa, se obtuvieron resultados variables entre positivos como negativos, la cual es reportado por diversos autores (Ewing *et al.*, 1978; Furones *et al.*, 1993; Concha, 1998; Davies & Frerichs, 1999; Akhlaghi & Sharifi, 2008; Buller, 2004; Sierralta, 2011), en el metabolismo de la úrea se obtuvo un 7% de

cepas atípicas las cuales dieron reacción positiva para esta prueba, y finalmente en el caso del metabolismo de la arginina hubo un 14% que dio resultados positivos lo cual guarda semejanza por lo reportado Ewing *et al.* (1978) quien obtiene cepas positivas a la prueba de arginina. En el caso de la fermentación del sorbitol se obtuvo que ninguna de las cepas lo fermentó, hecho que guarda relación con algunos autores que mencionan que las cepas más virulentas son las que no fermentan el sorbitol (Concha, 1998), pero se han reportado casos de brote de yersiniosis en *Oncorhynchus tshawytscha*, producidas por cepas que si fermentaban el sorbitol (Cipriano *et al.*, 1986), sin embargo se resalta el hecho que las cepas aisladas a partir de peces con sintomatología de enfermedad, ninguna metabolizó el sorbitol.

En el caso de la fermentación de la glucosa todas las cepas fermentaron la glucosa sin excepción. Además de los resultados obtenidos se puede apreciar que la cepas 12E y la 21E, presentan algunos resultados mas variables con respecto a los obtenidos para las otras cepas, así la cepa 21E es la única cepa que produce gas, resultado similar a lo reportado por Inglis *et al.* (1993), quienes sostienen que hay cepas que pueden producir gas cuando son incubadas a 18°C.

Otro hecho destacable es la fermentación de la xilosa, según Buller (2004), *Yersinia ruckeri*, puede ser diferenciada de *Hafnia alvei* por la fermentación de la xilosa, *Yersinia ruckeri* es negativa para esta prueba; sin embargo, *Hafnia alvei* es positiva para la fermentación de la xilosa. En el presente estudio algunas de las cepas aisladas tanto de peces sin sintomatología así como en las provenientes de peces con sintomatología, resultó positiva para esta prueba, de esto se podría deducir que las cepas de *Y. ruckeri* aisladas del centro piscícola “El Ingenio”, tienen características diferentes a las de los aislados en otras áreas geográficas. Esto significaría que las cepas de *Yersinia ruckeri* tienen características propias de cada región, así por ejemplo tenemos, que *Yersinia ruckeri*, que afecta la industria salmonera en Chile, presenta características propias del lugar, como la producción de gas a partir de glucosa, y la producción de hidrógeno sulfurado, que no son propias a las descritas para *Y. ruckeri* (Concha, 1998).

En el análisis del biotipo de las cepas obtenidas, se observa que todas sin excepción hidrolizaron el tween 20 y el tween 80, además todas evidenciaron motilidad, estas características evidenciarían que se trata de cepas con el biotipo 1 según Davies & Frerichs (1989).

En cuanto a la sensibilidad antibiótica de *Yersinia ruckeri* en el presente estudio se puede evidenciar que hay resistencia a los antibióticos utilizados, así se obtuvo que el 33.33 % de cepas provenientes de peces con sintomatología expresaron resistencia al menos a un antibiótico, de todas ellas el antibiótico al cual ofrecieron mayor resistencia fue al ácido oxolínico y a la tetraciclina con un 26,67% en ambos casos, hecho que se asemeja a lo investigado por Concha (1998), quien determinó que el ácido oxolínico es el antibiótico con mayor resistencia. Cabe resaltar que el 21% de cepas provenientes de peces sin sintomatología fueron amoxicilina resistente. Sierralta, (2011) reportó sensibilidad a muchos antibióticos en piscigranjas de la sierra central del Perú, hecho que no concuerda con lo obtenido en la presente investigación, donde se obtiene resistencia a los antibióticos analizados y observándose 4 cepas multiresistentes, todas obtenidas en piscigranjas del Centro Piscícola “El Ingenio”- Junín. Revisando la literatura internacional, se puede apreciar que los patrones de susceptibilidad de *Yersinia ruckeri* están cambiando significativamente dentro del ecosistema acuícola a medida que avanza el tiempo, hecho que se da por el uso inadecuado de antibióticos para controlar esta y otras patologías (Concha, 1998).

Para la identificación molecular de *Yersinia ruckeri* se utilizó la metodología recomendada por Gibello *et al.* (1999), la cual se basa en la amplificación de una región del ADN que codifica al ARN 16S, este autor describe esta metodología para el diagnóstico de este agente pero a partir de tejido de truchas infectadas, para el caso de la presente investigación se realizó la misma metodología pero a partir de colonias aisladas de órganos de truchas con y sin sintomatología de enfermedad, haciendo algunas modificaciones en la preparación del *master mix* y en las condiciones de amplificación, con las modificaciones realizadas se amplificó un fragmento de 575 pares de bases específico de *Yersinia ruckeri*, tal como lo reporta Sanchez (2010) quien a diferencia de los trabajos realizados por Gibello *et al.* (1999); Altinok *et al.* (2001); Kirkan *et al.* (2006), los cuales detectan la presencia de *Y. ruckeri* mediante la técnica de la PCR pero a partir de peces infectados de manera natural y artificialmente. En el presente trabajo también se pudo identificar a través de la PCR la presencia de *Y. ruckeri* en peces sin sintomatología tal como lo determinó Sánchez (2010).

De acuerdo a la cantidad de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas según órgano, se puede mencionar que el riñón fue el órgano del cual se aislaron más bacterias, ya que se obtuvo un total 14 cepas aisladas. Así mismo es importante resaltar que en el

caso de las cepas aisladas a partir de peces sin sintomatología, se obtiene un gran número de cepas a partir del intestino, este hecho es importante pues se ha determinado que dentro de una población de truchas arco iris más del 25% posee al agente *Yersinia ruckeri* en la parte posterior del intestino delgado (Romalde & Toranzo, 1993; Ryckaert *et al.*, 2010), así como también se ha determinado que luego de dos meses de presentarse un brote de yersiniosis se ha podido aislar el agente en las heces de los peces (Tobback *et al.*, 2009; Tobback, 2010).

Es importante mencionar que en los peces sin sintomatología también se aisló al agente etiológico de la EBR, esto confirmaría el hecho de que existe en dicha piscigranjas peces aparentemente sanos que estarían en las etapas tempranas de la infección o son portadores asintomáticos y éstos más adelante empezarían a evidenciar los signos clínicos de la enfermedad y a diseminar la bacteria al medio acuático.

La herramienta molecular del PCR ayuda a tener mayor precisión en cuanto a la identificación de *Yersinia ruckeri*, ya que en el presente trabajo se pudo observar que a través de pruebas bioquímicas se obtenían cepas presuntamente positivas, sin embargo al realizarles la prueba de PCR, se obtuvieron que de un total de 34 cepas presuntivas, determinadas por pruebas bioquímicas, 30 se confirmaron como tal a través de la técnica del PCR (Figura 8). De esta manera se corrobora lo reportado por Altinok & Kurt (2003), quienes mencionan que las técnicas moleculares como el PCR son potencialmente más rápidas y más sensibles que las pruebas serológicas y métodos histológicos los cuales son usados tradicionalmente para la identificación de patógenos en peces.

En el análisis genético molecular a través de ERIC, REP y BOX PCR, se obtuvo un dendrograma final (Figura 15) en la cual se agrupa las tres técnicas de genotipaje, en dicha figura se puede observar que las cepas en estudio manifiestan variabilidad genética y poca clonalidad dentro de la población de *Y. ruckeri* analizada, ello concuerda con lo reportado por Bastardo *et al.*(2012), quienes recientemente a través de la técnica del *multilocus sequence typing* (MLST) obtienen que de un total de 103 aislados de *Y. ruckeri* de diferentes áreas geográficas, identificaron 30 tipos diferentes de secuencias, de los cuales 21 fueron representados por un solo aislamiento, evidenciando alta diversidad genética. A diferencia de la técnica utilizado

por Bastardo *et al.* (2012), la del MLST, en la presente investigación se utilizó otras técnicas que también evidenciaron una variabilidad en las cepas de *Y. ruckeri*.

La presente investigación también concuerda con lo reportado por Bastardo *et al.* (2011b) quienes describen diversidad genética intraespecífica, para 11 cepas de *Y. ruckeri* de origen chileno, aislados a partir de *Salmo salar*, a través del análisis de genotipificación por ERIC-PCR Y REP-PCR.

Así mismo, nuestros resultados también son concordantes con lo reportado por Arias *et al.* (2007); Wheeler *et al.* (2009), quienes encontraron variabilidad genética entre los aislados de *Y. ruckeri* biotipo 1 y 2 por PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*), a diferencia de lo reportado por estos autores en la presente investigación sólo se obtuvo el biotipo 1, aun así se evidenció variabilidad genética entre estas cepas de *Yersinia ruckeri*.

Investigaciones en Perú, de aislados de *Yersinia ruckeri*, ponen en manifiesto una correlación importante entre las cepas peruanas con el tipo de cepa NCIMB 2194^T, ésta es una cepa tipo de *Yersinia ruckeri*, similar a la reportada por Ewing *et al.*, (1978) en Idaho, además manifiestan que las cepas peruanas tienen alta similaridad intraespecífica (Bastardo *et al.*, 2011a). Es importante tener en cuenta que los aislados de *Y. ruckeri* trabajados por Bastardo *et al.*, (2011a), todos son obtenidos a partir de un brote de Yersiniosis, lo cual podría estar relacionado con la poca variabilidad genética de dichas cepas, en cambio en la presente investigación se obtuvo una mayor variabilidad, tanto fenotípica como genotípicamente (Tabla 10, 11; Figura 15), ya que las cepas aisladas tenían diferente procedencia, las cepas de *Yersinia ruckeri* fueron obtenidas a partir de peces sin sintomatología de enfermedad y cepas obtenidas a partir de peces con sintomatología de enfermedad.

Así las cepas provenientes de peces con sintomatología de enfermedad tienen características propias que les permite diferenciarlos de las cepas que fueron aislados a partir de peces sin sintomatología de enfermedad. Además las cepas provenientes de peces con sintomatología tienden a agruparse en un clado y las cepas provenientes de peces sin sintomatología también tienden a agruparse en clados diferentes.

Originalmente *Yersinia ruckeri* se presentó como un organismo bastante homogéneo en sus diversas características serológicas, bioquímicas y morfológicas,

sin embargo, en los estudios realizados a través del tiempo y en diferentes áreas geográficas se ha podido constatar que la bacteria es mucho más heterogénea de lo que se había pensado (Concha, 1998), y la presente investigación aporta más a dicha afirmación, ya que de los diferentes resultados obtenidos se puede mostrar claramente la heterogeneidad de las cepas .

Los resultados obtenidos tanto en las pruebas fenotípicas y genotípicas realizadas permite afirmar que *Yersinia ruckeri*, es una bacteria que se adapta a las condiciones que le brinda el hospedero, así las cepas de *Y. ruckeri* aisladas a partir de peces con EBR, exhiben características específicas de patogenicidad, como la de producir signos clínicos, en cambio en las cepas obtenidas a partir de peces sin signos clínicos de la EBR no evidencian estas características de patogenicidad, lo que permiten el mantenimiento del hospedero como portador sano.

VII. CONCLUSIONES

1. Se determinó la presencia de *Yersinia ruckeri* en trucha arco iris del centro piscícola “El Ingenio”.
2. Se identificó *Yersinia ruckeri* Biotipo I en cepas con y sin sintomatología de la Enfermedad entérica de la boca roja.
3. De las cepas de *Y. ruckeri* analizadas, 12 expresaron resistencia a alguno de los antibióticos utilizados en este estudio; se determinó multiresistencia en 4 cepas.
4. Las cepas de *Yersinia ruckeri* identificadas presentan variabilidad genética.
5. Se determinó que las cepas de *Yersinia ruckeri* provenientes de truchas con sintomatología de la Enfermedad entérica de la boca roja no fermentan sorbitol y muestran genotipos que tienden a agruparse en clados separados de las cepas aisladas de truchas sin sintomatología de la Enfermedad de la boca roja entérica.

VIII. RECOMENDACIÓN

- Se recomienda seguir con el estudio de esta bacteria que afecta a los cultivos de truchas en el país, porque hay la necesidad de conocer mas aún sobre este patógeno, además es necesario saber cuales son las diferencias de las cepas nativas con cepas aisladas en otros países, esto puede ayudar a la obtención de una vacuna que controle la enfermedad producida por este agente.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHLAGHI, M & SHARIFI Y.H. Detection and identification of virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric redmouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*. 2008, vol. 9, n°4, p. 347-352.
- ALTINOK I., GRIZZLE, J.M. and LIU Z. Detection of *Yersinia ruckeri* in rainbow trout blood by use of the polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2001, vol. 44, p. 29-34.
- ALTINOK I. and KURT I. Molecular Diagnosis of Fish Diseases: a Review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2003, vol. 3, p. 131-138.
- APPLIED MATHS, USA. BioNumerics, the universal platform for databasing and analysis of all biological data. 2011, [Internet]. Disponible en: <http://www.applied-maths.com/>
- AQUINO Martínez, Guillermo Manual básico para el cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). 2009.
- ARIAS C.R., OLIVARES-F.O., HAYDEN K., SHOEMAKER, Craig A., Grizzle, John M., & Klesius, Phillip H. First Report of *Yersinia ruckeri* Biotype 2 in the USA. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2007, vol. 19, n°1, p. 35-40.
- AUSTIN, B and AUSTIN, DA. Bacterial fish pathogens-diseases of farmed and wild fish. Springer-Verlag. 2007, 2nd Edn., p. 188-226.
- AUSTIN, B., BISHOP, I., GRAY, C., WATT, B., & DAWES, J. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the rapid diagnosis of clinical cases of enteric redmouth and furunculosis in fish farms. *Journal of Fish Diseases*. 1986, vol. 9, n°5, p. 469-474.
- AUSTIN, B., GREEN, M., & RODGERS, C. J. Morphological diversity among strains of *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture*. 1982, vol. 27, n°1, p. 73-78.
- AUSTIN, D. A., ROBERTSON, P. A. W., & AUSTIN, B. Recovery of a New Biogroup of *Yersinia ruckeri* from Diseased Rainbow Trout (*Oncorhynchus*

- mykiss, Walbaum). *Systematic and Applied Microbiology*. 2003, vol. 26, n°1, p. 127-131.
- BARJA, J. L. y TORANZO. A.E. Infecciones causadas por Enterobacterias. Patología en Acuicultura, CAICYT. Madrid, España. 1988, p. 501-505.
 - BASTARDO A., BOHLE H., RAVELO C., TORANZO AE., ROMALDE JL. Serological and molecular heterogeneity among *Yersinia ruckeri* strains isolated from farmed Atlantic salmon *Salmo salar* in Chile. *Diseases of aquatic organisms*. 2011b, vol. 93, n°3, p. 207-214.
 - BASTARDO, Asmine, RAVELO, Carmen, & ROMALDE, Jesús L. A Polyphasic Approach To Study The Intraspecific Diversity Of *Yersinia ruckeri* Strains Isolated From Recent Outbreaks In Salmonid Culture. *Veterinary Microbiology*. 2012.
 - BASTARDO, Asmine, SIERRALTA, Veronica, LEÓN, Jorge, RAVELO, Carmen, & Romalde, Jesús L. Phenotypical and genetic characterization of *Yersinia ruckeri* strains isolated from recent outbreaks in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in Peru. *Aquaculture*. 2011a, vol. 317, n°1-4, p. 229-232.
 - BEDRIÑANA, S.M. Manual de producción de truchas Gobierno Regional Junin. 2009, 1ra ed., p. 90.
 - BRAVO S., KOJAGURA V. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú *Bull. Eur. Ass. Fish Pathology*. 2004, vol. 24, p. 104-108.
 - BRENNER Don J., KRIEG N. R., STALEY JAMES T., GARRITY GEORGE M. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Springer. 2005, two (The Proteobacteria), Part B.
 - BULLER, N.B. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual*. 2004. Department of Agriculture South Perth Western Australia.
 - BULLOCK, G. L., STUCKEY, H. M., HERMAN, R. L., & SMITH, C. E. Comparative susceptibility of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to the enteric

- redmouth bacterium and *Aeromonas salmonicida*. *J Wildl Dis.* 1976, vol. 12, n°3, p. 376-379.
- BULLOCK, G. L., STUCKEY, H. M., & SHOTTS, E. B. Enteric redmouth bacterium: comparison of isolates from different geographic areas. *Journal of Fish Diseases.* 1978, vol.1, n°4, p. 351-356.
 - BULLOCK G.L., and CIPRIANO R.C. Enteric Redmouth Disease of Salmonids *Fish Disease Leaflet.* 1990, vol. 82.
 - BUSCH, R. A. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). In Antigenes of Fish Pathogens. [D. P. Anderson, M. Dorson y Ph. Dubourget,, Lyon]. Symposium International de Talloires. 1982, p. 201 - 223.
 - BUSCH, R. A. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). [D. P. Anderson, M. Dorson, and Ph. Dubourget,]. Antigenes of fish pathogens. Collection Fondation Marcel Merieux, Lyon, France. 1983, p. 201-222.
 - BUSCH, R. A., & LINGG, A. J. Establishment of an Asymptomatic Carrier State Infection of Enteric Redmouth Disease in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 1975, vol.32, n°12, p. 2429-2432.
 - BUSCH, R.A. Enteric redmouth disease (Hagerman strain). *Mar. Fish. Rev.* 1978, vol. 40, p. 42-51.
 - CESCHIA, G., GIORGETTI, G., BERTOLDINI, G., & FONTEBASSO, S. The in vitro sensitivity of *Yersinia ruckeri* to specific antibiotics. *Journal of Fish Diseases.* 1987, vol. 10, n°1, p. 65-67.
 - CIPRIANO, RC, SCHILL, WB, PYLE, SW, & HORNER, R. An epizootic in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by a sorbitol-positive serovar 2 strain of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Wildlife Diseases.* 1986, vol. 22, n°4, p. 488-492.
 - CONCHA Alberti, Francisco Rodrigo Caracterización bioquímica, electroforética y sensibilidad antibiótica de cepas de *Yersinia ruckeri* aisladas desde Salmón del Atlántico (*Salmo salar*). 1998. Universidad Austral De Chile Facultad de Ciencias Veterinarias Instituto de Patología Animal Ictiopatología.

- COQUET, L., COSETTE, P., QUILLET, L., PETIT, F., JUNTER, G.-A., & JOUENNE, T. Occurrence and Phenotypic Characterization of *Yersinia ruckeri* Strains with Biofilm-Forming Capacity in a Rainbow Trout Farm. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, vol. 68, n°2, p. 470-475.
- DANLEY, M. L., GOODWIN, A. E., & KILLIAN, H. S. Epizootics in farm-raised channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), caused by the enteric redmouth bacterium *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 1999, vol. 22, n°6, p. 451-456.
- DAVIES, R. L., & FRERICHS, G. N. Morphological and biochemical differences among isolates of *Yersinia ruckeri* obtained from wide geographical areas. *Journal of Fish Diseases*. 1989, vol. 12, n°4, p. 357-365.
- DE GRANDIS, S A, & STEVENSON, R M. Antimicrobial susceptibility patterns and R plasmid-mediated resistance of the fish pathogen *Yersinia ruckeri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1985, vol. 27, n°6, p. 938-942.
- DE LA CRUZ J. A., RODRIGUEZ A., TEJEDOR C. DE LUCAS E. & OROZEO L. R. Isolation and identification of *Yersinia ruckeri*, causal agent of the enteric redmouth disease (ERM), for the first time in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1986, vol. 6, p. 43-44.
- DE LAMBALLERIE, X., ZANDOTTI, C., VIGNOLI, C., BOLLET, C., & de MICCO, P. A one-step microbial DNA extraction method using "Chelex 100" suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*. 1992, vol. 143, n°8, p. 785-790.
- DILL, W. A. and A. J. CORDONE. History and status of introduced fishes in California, 1871–1996. California Department of Fish and Game, *Fish Bulletin*. 1997, vol. 178.
- DULIN, M. P., T. HUDDLESTON, R. E. LARSON, and G. W. KLONTZ. Enteric redmouth disease. Univ. Idaho, Moscow, For. Wildl. Range Exp. Stn., Contrib. 1976, vol. 16, p. 15.
- EVENHUIS, JASON P., LAPATRA, SCOTT E., VERNER-Jeffreys, David W., DALSGAARD, INGER, & WELCH, Timothy J. Identification of Flagellar Motility Genes in *Yersinia ruckeri* by Transposon Mutagenesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, vol. 75, n°20, p. 6630-6633.

- EWING, W. H., ROSS, A. J., BRENNER, Don J., and FANNING, G. R. *Yersinia ruckeri* sp. nov., the Redmouth (RM) Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1978, vol. 28, n°1, p. 37-44.
- FAO. Development of intensive freshwater fish culture project, the Hungarian People's Republic. *Fish disease research*. 1982.
- FAO. Estadísticas de pesca y acuicultura 2008. Roma, 72. 2010a.
- FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. Roma, 72. 2010b.
- FERNÁNDEZ, L., MÁRQUEZ, I., & GUIJARRO, J. A. Identification of Specific In Vivo-Induced (ivi) Genes in *Yersinia ruckeri* and Analysis of Ruckerbactin, a Catecholate Siderophore Iron Acquisition System. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, n°9, p. 5199-5207.
- FERNÁNDEZ, C.F. Aplicaciones de las técnicas del PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2004b, vol. 22, p. 355-360.
- FERNANDEZ, L; LOPEZ, J.R; SECADES, P; MENENDEZ, A; MARQUEZ, I; GUIJARRO, J.A. In vitro and in vivo studies of the Yrp1 proteasa from *Yersinia ruckeri* and Its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids *Appl Environ Microbiol*. 2003, vol. 69, n°12, p. 7328-7335.
- FERNÁNDEZ NUÑEZ, Carlos Alberto Determinación DE *Yersinia ruckeri* Y Características Lesiónales Anatomo-Histopatológicas En Truchas Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) En Etapa Pre-Comercial En Una Piscigranja De La Región Junín. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima, 2011.
- FRERICHS, G. N., STEWART, J. A., & COLLINS, R. O. Atypical infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, with *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 1985, vol. 8, n°4, p. 383-387.
- FUHRMANN, H., BÖHM, K. H., & SCHLOTFELDT, H. J. An outbreak of enteric redmouth disease in West Germany. *Journal of Fish Diseases*. 1983, vol. 6, n°3, p. 309-311.

- FUHRMANN, H., BOHM, K.H., SCHLOTFELDT, H-J. On the importance of enteric bacteria in the bacteriology of freshwater. *Fish. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 1984, vol. 4, p. 42-46.
- FURONES, M. D., RODGERS, C. J., & MUNN, C. B. *Yersinia ruckeri*, the causal agent of enteric redmouth disease (ERM) in fish. *Annual review of fish diseases.* 1993, vol. 3, p. 105-125.
- GIBELLO A., BLANCO M. M., MORENO M. A., CUTULI M. T., DOMENECH A., DOMINGUEZ I., FERNANDEZ-Garayzabal J. F. Development of a PCR Assay for Detection of *Yersinia ruckeri* in Tissues of Inoculated and Naturally Infected Trout. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999, vol. 65, n°1, p. 346–350.
- GODOY, M. Truchicultura. Producciones GAMA Ayacucho - Perú. 2003.
- GRASER, Y.C., I; HALLE, E; GANTENBERG, R; BUCHHOLZ, P and JACOBI, H. D. Epidemiological study of an *Acinetobacter baumannii* outbreak by polimerase chain reaction reaction fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993, vol. 3, p. 2417-2420.
- HUNTER, Valerie A., KNITTEL, M. D., & FRYER, J. L. Stress-induced transmission of *Yersinia ruckeri* infection from carriers to recipient steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases.* 1980, vol. 3, n°6, p. 467-472.
- INGLIS V., ROBERTS, R. J., BROMAGE, N. R. Bacterial diseases of fish. 1993, p. 312.
- KIRKAN, S., GOKSOY, E., KAYA O., TEKBIYIK S. In-vitro Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic Bacteria in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2006.
- KOJAGURA, V. and ALVARADO, D. Aspectos de la epizootia de “Boca Roja” (*Yersinia ruckeri*) en criaderos de “truchas” (*Oncorhynchus mykiss*) de la Comunidad de Huaros - Canta, Lima. Res. XVI Congreso Nacional de Biología y X Simposium Nacional de Educación en Ciencias Biológicas. Piura-Perú. 2006.

- LLEWELLYN, L. C. A bacterium with similarities to the redmouth bacterium and *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) causing mortalities in hatchery reared salmonids in Australia. *Journal of Fish Diseases*. 1980, vol. 3, n°1, p. 29-39.
- MANRIQUE Ramirez, P.C. Estudio Bacteriológico y Caracterización Molecular por ERIC-PCR del *Haemophilus parasuis* en granjas porcinas intensivas de Colombia. Universidad Javeriana Colombia, 2010.
- MCARDLE, J.F., and C. DOOLEY-MARTYN. Isolation of *Yersinia ruckeri* type I (Hagerman strain) from goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Eur. Assoc, Fish Pathol*. 1985, vol. 5, p. 10 - 11.
- MCCORMICK, J.I. and MCLOUGHLIN, M.F. The characterisation and pathogenicity of the first isolate of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Northern Ireland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*. 1993, vol. 13, p. 138-140.
- MCDANIEL, David. Procedures for the detection and identification of certain fish pathogens American Fisheries Society. *Fish Health Section*. 1979, p. 118.
- NCCLS. National Committee for clinical Laboratory Standards, 2009.
- O'LEARY, P.J., J.S. ROHOVEC y J.L. FRYER. A further characterization of *Yersinia ruckeri* (enteric redmouth bacterium). *Fish Pathology*. 1979, vol. 14, n°2, p. 71-78.
- OIE, Organización Mundial de Sanidad Animal. Manual de pruebas de diagnóstico para los animales acuáticos. 2006, 5° Ed., p. 73-87.
- OLIVE, D.M. and BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol. 37, p.1661-1669.
- PRODUCE. Catastro Acuicola. Ministerio de la Producción, 2009.
- PRODUCE. Anuario Estadístico 2010, 2010.
- REIMSCHUESSEL, Renate, BENNETT, Richard O., & LIPSKY, Michael M. Communications: A Classification System for Histological Lesions. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1992, vol. 4, n°2, p. 135-143

- REVELL, P. A., & MILLER, V. L. *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, vol. 205, n°2, p. 159-164.
- RICHARDS, R.H. and ROBERTS, R.J. Bacteriology of teleosts. In: Roberts, R.J. (ed.). London, Bailliere Tindall, *Fish Pathology*. 1978, p. 183-204.
- RIVAS J., REDONDO C., ALONSO G. Genotipificación de cepas de enterobacterias procedentes de 4 centros de salud del área de Caracas. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana*. 2006, vol. 9, n°2, p. 3-7.
- RODGERS, C. J. The usage of vaccination and antimicrobial agents for control of *Yersinia ruckeri*. *Journal fish Disease*. 1991, vol. 14, p. 291-301.
- RODGERS, C. J. Development of a selective-differential medium for the isolation of *Yersinia ruckeri* and its application in epidemiological studies. *Journal of Fish Diseases*. 1992, vol. 15, n°3, p. 243-254.
- RODGERS, C.J. and AUSTIN, B. . Oxolinic acid for control of enteric redmouth disease in rainbow trout. *Veterinary Record*. 1983, vol. 112, n°4, p. 83.
- ROJAS R., JURADO M., QUILCA R., HUMBERTO C., LÓPEZ E., VERASTEGUI J. Manual para la Producción de Truchas en Jaulas Flotantes, 2008.
- ROMALDE, Jesús L., CONCHAS, Ramón F., & TORANZO, Alicia E. Evidence that *Yersinia ruckeri* possesses a high affinity iron uptake system. *FEMS Microbiology Letters*. 1991, vol. 80, n° (2-3), p. 121-125.
- ROSS, A. J., RUCKER, R. R., & EWING, W. H. Description of a Bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Microbiology*. 1966, vol. 12, n°4, p. 763-770.
- RUCKER, R. Redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin de L' Office International des Epizooties*. 1966, vol. 65, p. 825-830.
- SÁNCHEZ ROBINET, Claudia Cecilia Diagnóstico molecular (PCR) de *Yersinia ruckeri* aislada de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). Universidad Nacional de Federico Villareal, Facultad de Oceanografía, Pesquería y Ciencias Alimentarias, Lima, 2010.

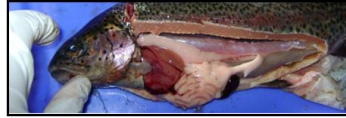
- SIERRA, Gonzalo. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1957, vol. 23, n°1, p. 15-22.
- SIERRALTA CHICHIZOLA, Veronica Anamaria. Estado situacional de *Yersinia ruckeri* causante de la enfermedad entérica de la Boca Roja en trucha Arco Iris *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) en piscigranjas de la sierra central del Perú - 2008. Universidad Nacional de San Marcos Facultad de Ciencias Biologicas, Lima, 2011.
- SMITH, Gerald R., & STEARLEY, Ralph F. The Classification and Scientific Names of Rainbow and Cutthroat Trouts. *Fisheries*. 1989, vol. 14, n°1, p. 4-10.
- SMITH, Pete. Breakpoints for disc diffusion susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases: A review of current practice. *Aquaculture*. 2006, vol. 261, n°4, p. 1113-1121.
- STEVENSON, R. M. W., & AIRDRIE, D. W. Serological variation among *Yersinia ruckeri* strains. *Journal of Fish Diseases*. 1984, vol. 7, n°4, p. 247-254.
- STEVENSON, R. M. W., & DALY, J. G. Biochemical and Serological Characteristics of Ontario Isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 1982, vol. 39, n°6, p. 870-876.
- SVENDSEN, YNGVAR S. and BØGWALD, Jarl. Influence of artificial wound and non-intact mucus layer on mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) following a bath challenge with *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*. 1997, vol. 7, n°5, p. 317-325.
- TEMPRANO, A., YUGUEROS, J., HERNANZ, C., SÁNCHEZ, M., BERZAL, B., LUENGO, J. M., & Naharro, G. Rapid identification of *Yersinia ruckeri* by PCR amplification of *yrul-yruR* quorum sensing. *Journal of Fish Diseases*. 2001, vol. 24, n°5, p. 253-261.
- TOBBACK, E. Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Faculty of Veterinary Medicine Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, 2009

- TOBBACK, E., K. HERMANS, A. DECOSTERE, W. van den BROECK, F. HAESBROUCK and K. CHIERS. Interactions of virulent and avirulent *Yersinia ruckeri* strains with isolated gill arches and intestinal explants of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2010, vol. 90, p. 175-179.
- TRONCOSO H, Miriam; TOLEDO B, Maria S.; PORTELL V, Pilar; FIGUEROA G, Guillermo. Aislamiento de *Yersinia ruckeri* en salmónidos de cultivo. *Avances en Medicina Veterinaria*. 1994, vol. 9, n°2, p. 122-127.
- VERSALOVIC, James, KOEUTH, Thearith, & LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*. 1991, vol. 19, n°24, p. 6823-6831.
- VIBOUD, Gloria I., & BLISKA, James B. *Yersinia* Outer Proteins: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*. 2005, vol. 59, n°1, p. 69-89.
- VIGNEULLE M. Yersinose des salmonides: etude comparee de differents modes de vaccination. *Ichthyophysiological Acta*. 1990, vol. 13, p. 43-58.
- WHEELER RW., Davies RL., DALSGAARD I., Garcia J., WELCH TJ., WAGLEY S., BATEMAN KS., VERNER-JEFFREYS DW. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. *Diseases of aquatic organisms*. 2009, vol. 84, n°1, p. 25-33.
- WILLUMSEN, B. Birds and wild fish as potential vectors of *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*. 1989, vol. 12, n°3, p. 275-277.
- WOO, P.T.K. and BRUNO, D.W. (eds) *Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial and Fungal Infections*. CAB International, Wallingford, UK., 3. 1999, vol. 3.

X. ANEXOS

10.1. Aislamiento de *Yersinia ruckeri*

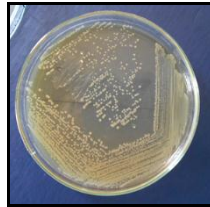
Flujograma del Aislamiento de *Yersinia ruckeri*



Muestra de Bazo y Riñón de trucha Arco iris



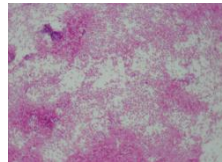
Sembrar en Agar TSA por estriado



Incubar a 22°C por 24 a 48 horas



Realizar coloración Gram, pruebas de catalasa y oxidasa



Pruebas Bioquímicas
para identificación de
especie

Cepario



10.2. Preparación de soluciones

a) Buffer TAE 50x

Pesar 24,2 g de Tris Base, 1,8612 g de EDTA di Na. 2 H₂O. Disolver en 57.1 ml de ácido acético glacial, completar el volumen hasta 100 ml con agua bidestilada (H₂Odd). Ajustar el buffer a un pH: 8. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

b) Buffer TAE 1x

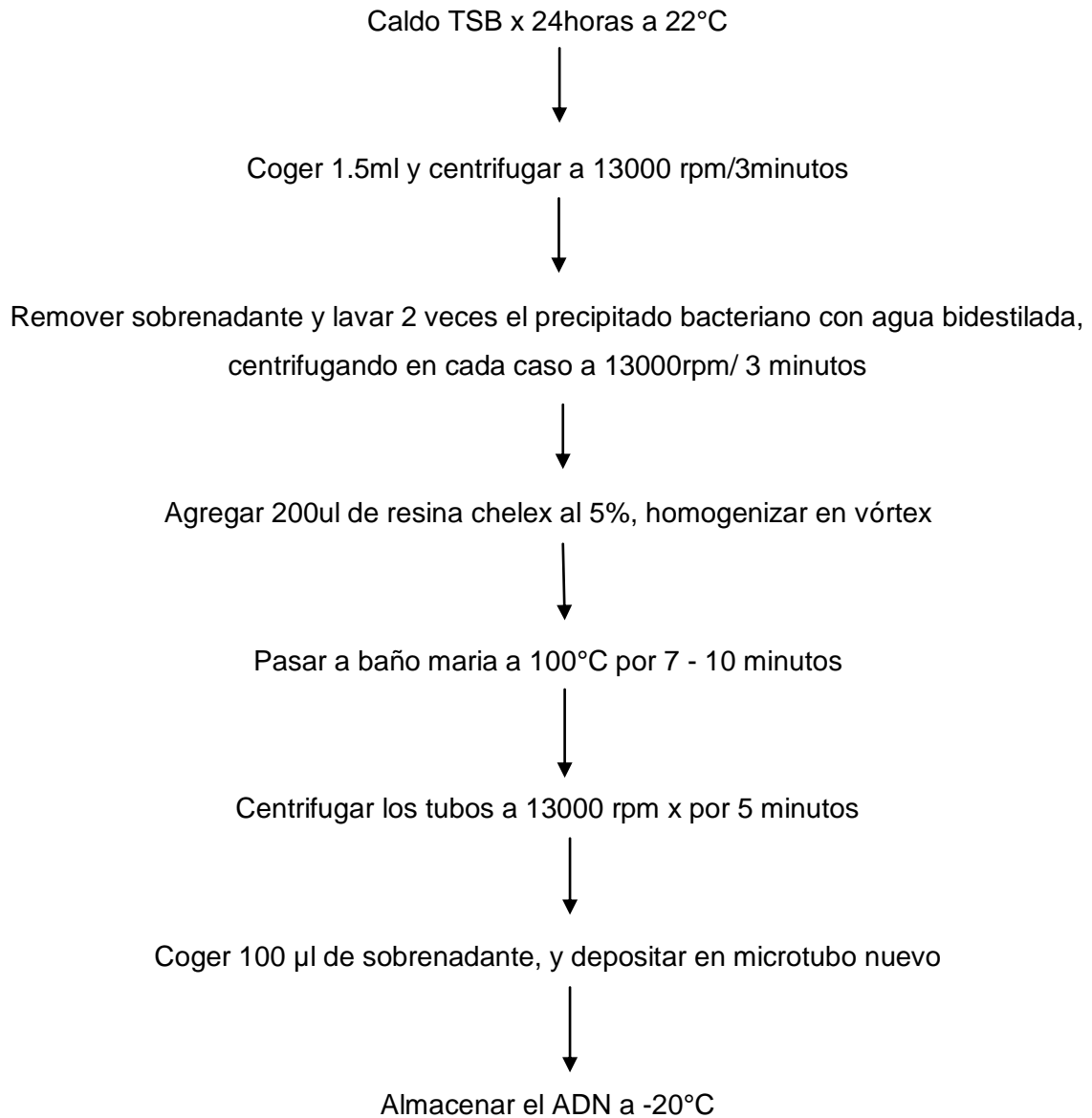
Disolver 10ml de de buffer TAE 50x en 500ml de H₂Odd

c) Buffer de carga para ADN 2x

Pesar 0,05g de SDS, 0,0447g de EDTA y 0,005g de Azul de Bromofenol, disolver 2.5ml de glicerol, completar volumen a 10ml con H₂Odd. Ajustar pH a 8.

10.3. Protocolo de extracción de ADN

Extracción de ADN de *Yersinia ruckeri*



10.4. Datos del Centro Piscícola “El Ingenio”

Distrito: Ingenio

Provincia: Huancayo

Región: Junín

Longitud Oeste: 75° 15' 22''

Latitud Sur: 11° 52' 42''

Altitud: 3 452 msnm

Superficie: 52 236 m² (5.2 Ha)

Origen: Río Chía

Caudal: 2 500 L/ seg. En época de lluvia.

750L/ seg. En época de estiaje.

Producción Aproximada: 180 TM de carne de trucha comercial.

10.5. Figuras: Toma y selección de muestra



10.5.1. Peces Enfermos en Pozas de cultivo



10.5.2. Tomando muestra de piscigranja



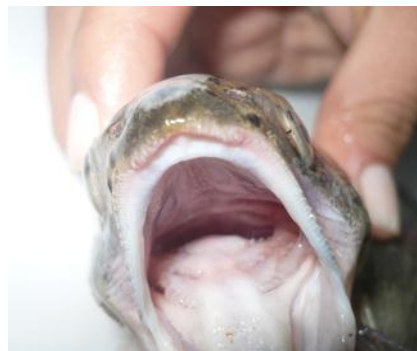
10.5.3. Seleccionando Peces Sanos-Enfermo



10.5.4. Trucha con Abdomen distendido



10.5.5. Trucha con Exoftalmia Unilateral



10.5.6. Trucha con "boca roja"